

CRISTINA SANTOS SOTOMAIOR

**POLIMORFISMO DO GENE DA PROTEÍNA PRION CELULAR (PrP^C)
E A SUSCEPTIBILIDADE/RESISTÊNCIA AO SCRAPIE EM OVINOS
NO ESTADO DO PARANÁ**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, área de concentração: Saúde Animal, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Processos Biotecnológicos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanete Thomaz Soccol

CURITIBA

2007

À minha família, NEWTON e
RUTH, VANESSA, LINCON e
LUCAS (o mais novo
integrante) dedico este
trabalho, com carinho.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Vanete Thomaz Soccol, pela orientação, pela oportunidade de trabalhar novamente em seu laboratório e pelo suporte financeiro.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, nas pessoas do Prof. Dr. Ricardo Soccol e da Prof^a. Dr^a. Luciana Vandenberghe, pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional e científico.

Ao Prof. David Driemeier, por aceitar o convite para participar deste trabalho e ser sempre tão atencioso e prestativo.

Ao Prof. Humberto Maciel França Madeira, por abrir a portas do laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Agropecuária da PUCPR e às colegas Lilian Pereira e Jane Gabriel pelo auxílio no laboratório.

Ao Prof. Dr. Emanuel de Souza, do departamento de Bioquímica da UFPR, por permitir a realização dos seqüenciamentos em seu laboratório e ao Valter Baura, pelas análises realizadas e pela forma sempre gentil de nos receber.

Aos professores Silvio Zanata e Humberto Madeira, pela participação na banca de qualificação e pelas sugestões para o aprimoramento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia Molecular: Samira, Nelson, Juliana, Luciana, Silvana, Yanê, Sandro, André, Silvia, Ellen, Soraia pelas muitas horas de convivência, pela troca de informações e experiências e pelas “terapias de grupo”.

Aos que contribuíram na colheita de amostras de sangue: Fernando Pansera Dalla Costa, Alexandre D’Agostin Borges, Maria da Graça Schwartz, Jannifer Silva Caldas, Izaltino Cordeiro dos Santos e Licius Schuhli, e aos que auxiliaram no abate dos animais e colheita das amostras para a imunohistoquímica.

A todos os proprietários que gentilmente cederam amostras de sangue de seus animais.

Aos meus pais, pelo apoio, carinho e compreensão.

À minha irmã Vanessa, por ser novamente o alento às minhas aflições, a clareza e sabedoria nos momentos de indecisão e, sobretudo, um exemplo de cientista, amiga e irmã. Sem você, eu não teria conseguido.

Às amigas Viviane Milczewski e Fernanda Rosalinski Moraes, por aceitarem este desafio junto comigo, por dividirem todos os momentos e, especial, pela certeza da amizade.

Às amigas e sócias da DUOVET, Viviane, Graça, Jannifer e Lorena, por compartilharem o amor, respeito e dedicação aos pequenos ruminantes.

Ao amigo Alejandro Correa Domingues, por orientar os primeiros passos desta jornada.

Aos amigos e colegas da PUC Felipe Pohl de Souza e Daniel Ollhoff pelo apoio e companheirismo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE QUADROS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	001
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	005
2.1 ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISSÍVEIS.....	005
2.2 PRIONS.....	007
2.3 SCRAPIE.....	012
2.3.1 Epidemiologia.....	012
2.3.2 Transmissão.....	016
2.3.3 Patogenia.....	017
2.3.4 Sinais clínicos.....	018
2.3.5 Diagnóstico.....	019
2.3.5.1 Diagnóstico pré-clínico.....	022
2.3.6 Scrapie atípico.....	023
2.4 ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME BOVINA EM OVINOS.....	024
2.5 O PAPEL DA GENÉTICA NA EPIDEMIOLOGIA E PATOGENIA DO SCRAPIE.....	025
2.6 PLANOS NACIONAIS DE CONTROLE DO SCRAPIE.....	030
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	035
3.1 SELEÇÃO DE REBANHOS.....	036
3.2 GENOTIPAGEM.....	037
3.2.1 Extração e purificação do DNA.....	037
3.2.2 PCR-RFLP.....	039
3.2.3 Seqüenciamento.....	044
3.3 DIAGNÓSTICO DA PrP ^{Sc} POR IMUNOHISTOQUÍMICA.....	046
3.4 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENÓTIPICAS.....	048

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	049
4 RESULTADOS	050
4.1 ANIMAIS.....	050
4.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA.....	051
4.3 PCR e RFLP.....	052
4.4 SEQUENCIAMENTO.....	055
4.5 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS.....	058
4.6 CASOS CLÍNICOS.....	063
4.7 DIAGNÓSTICO DA PrP ^{Sc} POR IMUNOHISTOQUÍMICA.....	065
4.8 CORRELAÇÃO IHQ E GENOTIPAGEM.....	067
5 DISCUSSÃO	071
6 CONCLUSÃO	097
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	098
8 REFERÊNCIAS	099

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura secundária das isoformas da proteína priônica	
a) PrP ^C com estruturas predominantes em α hélices	
b) PrP ^{Sc} com estruturas predominantes em β folha.....	09
FIGURA 2 – Países membros da União Européia onde casos de EETs foram relatados em 2005.....	13
FIGURA 3 – Estados americanos e a localização de rebanhos positivos para scrapie no ano de 2005.....	14
FIGURA 4 – Fluxograma das etapas da genotipagem do gene PrP, para os códons 136, 154 e 171, de diferentes raças de ovinos do Estado do Paraná.....	35
FIGURA 5 – Sítios artificiais de restrição, criados pelos iniciadores reversos 3 e 4, nos produtos de amplificação da primeira e segunda PCR e clivados por enzimas de restrição.....	42
FIGURA 6 – Porcentagem de participação de cada uma das raças ovinas, nas 325 amostras de sangue colhidas para genotipagem para resistência ao scrapie.....	50
FIGURA 7 – Avaliação da integridade, qualidade e quantidade de DNA.....	52
FIGURA 8 – Produtos de PCR de 197/196 pb em gel de agarose a 1,6% e corados com brometo de etídeo.....	52
FIGURA 9 – Análise dos sete genótipos do gene PrP identificados pela técnica de PCR-RFLP.....	53
FIGURA 10 – Produtos da RFLP em gel de agarose a 2,5%, corados com brometo de etídeo e analisados pelo programa GELPRO analyzer.....	54
FIGURA 11 – Distribuição dos sete genótipos do gene PrP, encontrados nas 307 amostras de ovinos procedentes do Estado do Paraná, Brasil, analisadas segundo a técnica de PCR-RFLP.....	55
FIGURA 12 – Avaliação de banda única de produtos de PCR de 771 pb.....	56
FIGURA 13 – Eletroferograma de duas amostras seqüenciadas, na região entre os nucleotídeos 500 e 534.....	56

FIGURA 14 – Eletroferograma da amostra 397, na região do códon 171, mostrando uma amostra heterozigota para os nucleotídeos guanina (CGG -Arginina) e adenina (CAG – Glutamina), resultando no genótipo RQ.....	57
FIGURA 15 – Número de animais de cada uma das raças ovinas, nas 325 amostras genotipadas do gene PrP, pelas técnicas de PCR-RFLP e seqüenciamento.....	58
FIGURA 16 – Distribuição das freqüências genotípicas, segundo a raça, dos 325 animais genotipados pelo método de PCR-RFLP e seqüenciamento.....	60
FIGURA 17 – Animal com histórico e diagnóstico laboratorial confirmado para scrapie. Queda de lã devido ao prurido.....	64
FIGURA 18 – Animal com histórico e diagnóstico laboratorial confirmado para scrapie. Áreas de alopecia e edema devido ao prurido.....	65
FIGURA 19 – Coloração imunohistoquímica do anticorpo monoclonal F89/160.1.5 em tonsila de ovino.....	66
FIGURA 20 – Número de animais, de acordo com o genótipo e a raça (Hampshire Down - HD e mestiços) do rebanho potencialmente contaminado por scrapie.....	67
FIGURA 21 – Número e porcentagem de ovinos com IHQ positiva (n=15) em relação aos seis genótipos encontrados no rebanho da PUCPR...	68
FIGURA 22 – Número de amostras positivas e negativas para IHQ em relação aos seis genótipos encontrados no rebanho da PUCPR.....	69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Polimorfismos confirmados do gene PrP encontrados em ovinos....	27
TABELA 2 – Classificação dos diferentes genótipos encontrados em ovinos, em raças onde os 5 alelos estão presentes, quanto à resistência/susceptibilidade ao scrapie.....	28
TABELA 3 – Classificação dos diferentes genótipos encontrados em ovinos quanto ao grau de resistência/susceptibilidade ao scrapie, segundo o <i>Ram Genotyping Scheme</i> do NSP.....	31
TABELA 4 – Classificação dos diferentes genótipos encontrados em ovinos quanto ao grau de resistência/susceptibilidade ao scrapie, segundo o <i>The National Genetics Based Flock Clean-up Plan</i> nos EUA.....	33
TABELA 5 – Componentes e suas concentrações nas duas reações de PCR realizadas para a posterior clivagem por enzimas de restrição.....	39
TABELA 6 – Componentes e suas concentrações nas reações de clivagem dos produtos das duas PCR pelas ER <i>BspDI</i> e <i>BspHI</i>	41
TABELA 7 – Tamanhos dos produtos de PCR com 197 e 196 pb, após a digestão com as enzimas <i>BspHI</i> e <i>BspDI</i> dos 5 alelos e 15 genótipos do gene PrP comumente encontrados em ovinos.....	43
TABELA 8 – Componentes e suas concentrações na reação de PCR realizada para o posterior seqüenciamento.....	44
TABELA 9 – Número de animais e de rebanhos diferentes, segundo a raça.....	51
TABELA 10 – Distribuição (n) dos 4 genótipos, segundo a raça, das 28 amostras genotipadas pelo método do seqüenciamento.....	57
TABELA 11 – Distribuição (n) dos sete genótipos, segundo a raça, dos 325 animais genotipados pelo método de PCR-RFLP e seqüenciamento.....	59
TABELA 12 – Frequências genotípicas, segundo a raça, dos animais genotipados pelo método de PCR-RFLP e seqüenciamento.....	61

TABELA 13 – Freqüências alélicas, segundo a raça, dos animais genotipados pelo método de PCR-RFLP e seqüenciamento.....	62
TABELA 14 – Porcentagem de animais segundo classificação em tipo 1, 2, 3, 4, ou 5, de acordo com o NSP, para as diferentes raças.....	63
TABELA 15 – Órgãos positivos na IHQ das 15 amostras positivas para scrapie e a porcentagem de amostras positivas para cada um deles em relação ao número total de amostras positivas.....	66
TABELA 16 – Freqüências genotípicas dos ovinos Hampshire Down (HD) e mestiços do rebanho da PUCPR, comparando os animais com IHQ positiva e negativa para a presença da PrP ^{Sc}	70

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Características da forma normal e anormal da proteína priônica (PrP).....	10
QUADRO 2 – Propriedades do agente infeccioso das EETs (prion).....	11
QUADRO 3 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas duas reações de PCR-RFPL para amplificação do gene PrP.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

- AHQ: alelo do gene PrP com os aminoácidos alanina, histidina e glutamina, considerando os códons 136, 154 e 171, respectivamente
- ARCO: Associação Brasileira de Criadores de Ovinos
- ARH: alelo do gene PrP com os aminoácidos alanina, arginina e histidina, considerando os códons 136, 154 e 171, respectivamente
- ARQ: alelo do gene PrP com os aminoácidos alanina, arginina e glutamina, considerando os códons 136, 154 e 171, respectivamente
- ARR: alelo do gene PrP com os aminoácidos alanina, arginina e arginina, considerando os códons 136, 154 e 171, respectivamente
- DAB: diaminobenzidina
- DCJ: Doença de Creutzfeldt-Jakob
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- dNTP: deoxirribonucleotídeos trifosfatados
- EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
- EEB: Encefalopatia Espongiforme Bovina
- EET: Encefalopatia Espongiforme Transmissível
- EGS: do termo em inglês *Ewe Genotyping Service*
- ELISA: do termo em inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
- ER: enzimas de restrição
- FRET: do termo em inglês *Fluorescence Resonance Energy Transfer*
- GALT: tecido linfóide associado ao intestino (do termo em inglês *Gut-associated lymphoid tissues*)
- GBR: do termo em inglês *Geographical BSE-Risk*
- GPI: glicofosfatidilinositol
- HD: Hampshire Down
- IHQ: Imunohistoquímica
- MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MBM: farinha de ossos e carne (do termo em inglês *meat and bone meal*)
- NSP: *National Scrapie Plan*
- OIE: Organização Mundial de Saúde Animal
- pb: pares de base

PBS: solução salina fosfatada

PCR: reação em cadeia pela DNA polimerase (do termo em inglês *Polimerase Chain Reaction*)

PK: proteinase K

PNSCO: Programa Nacional de Sanidade de Ovinos e Caprinos

PO: puros de origem

PRNP: gene da proteína priônica

PrP: proteína priônica

PrP^C: proteína priônica celular (normal)

PrP^{Sc}: proteína priônica anormal

PUCPR: Pontifícia Universidade Católica do Paraná

QTL: do termo em inglês *Quantitative Trait Loci*

RFLP: polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (do termo em inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*)

RGS: do termo em inglês *Ram Genotyping Scheme*

SAP: do termo em inglês *shrimp alkaline phosphatase*

SIM: Sistema de Informação de Mortalidade

SN: Sistema Nervoso

SNC: Sistema Nervoso Central

SNE: Sistema Nervoso Entérico

SRD: sem raça definida

TBST: tampão tris com tween 20

TE: tampão tris EDTA

TL: tampão de lise

UE: União Européia

vDCJ: variante da Doença de Creutzfeldt-Jakob

VRQ: alelo do gene PrP com os aminoácidos valina, arginina e glutamina, considerando os códons 136, 154 e 171, respectivamente

RESUMO

Scrapie é uma doença neurodegenerativa, progressiva e fatal de ovinos e caprinos, caracterizada por lesões de vacuolização no sistema nervoso central. Os principais sinais clínicos são: prurido, alterações no comportamento, incoordenação motora, ataxia e perda progressiva de peso. O acúmulo de uma isoforma anormal da proteína priônica (PrP) do hospedeiro no tecido nervoso é a causa do scrapie. Devido ao longo período de incubação e ao conhecimento ainda incompleto das vias de contaminação, o controle desta doença é difícil. A genética tem um papel importante no desenvolvimento do scrapie. Polimorfismos nos códons 136, 154 e 171 do gene PrP estão associados a alterações na susceptibilidade a esta doença infecciosa. Países onde a doença é endêmica têm utilizado cruzamentos seletivos de ovinos com o objetivo de aumentar a frequência dos alelos associados à resistência e de reduzir a dos alelos associados a maior susceptibilidade. No Brasil, o estado do Paraná é o que apresenta o maior número de casos notificados de scrapie. Porém, não há estudos feitos sobre polimorfismo do gene PrP nos ovinos criados neste estado. O objetivo deste trabalho foi avaliar se há polimorfismo deste gene nestes animais. Foram determinados os genótipos de 325 ovinos de diferentes raças de corte (Suffolk, Hampshire Down, Texel, Ile de France, Dorper, Dorset, Santa Inês e de animais mestiços). Para tanto, foram empregadas as técnicas PCR-RFLP e seqüenciamento gênico na identificação de cinco alelos do gene PrP considerando a combinação dos polimorfismo nos códons 136 (alanina, A / valina, V), 154 (histidina, H / arginina, R) e 171 (histidina, H / glutamina, Q / arginina, R). O alelo mais freqüente foi o ARQ, com média de 0,65, seguido pelo alelo ARR, com 0,30. Os alelos VRQ e AHQ apareceram com baixas freqüências, inferiores a 0,13 e 0,05, respectivamente. O alelo ARH não foi encontrado. Foram identificados sete genótipos (ARR/ARR, ARR/ARQ, ARQ/ARQ; ARR/VRQ, ARR/AHQ, ARQ/VRQ e ARQ/AHQ), sendo o mais freqüente o ARQ/ARQ (média de 0,40) e não tendo sido encontrado nenhum animal VRQ/VRQ, genótipo associado à maior susceptibilidade. Os genótipos ARQ/ARQ e ARR/ARQ estavam presentes em todas as raças. Os animais com maior variabilidade genotípica foram os da raça Santa Inês e os mestiços. Entre os rebanhos analisados, havia um com casos notificados de scrapie. Todos os animais deste rebanho, 47 puros da raça Hampshire Down e 71 mestiços, foram abatidos e amostras de tecido foram submetidas à técnica de imunohistoquímica. Houve 15 animais positivos, nenhum do genótipo ARR/ARR. Nos animais puros não houve diferença entre o número de animais positivos e negativos dos diferentes genótipos. Nos animais mestiços, houve diferença significativa no grupo de animais ARQ/ARQ, não havendo animais positivos deste genótipo. Também houve diferença significativa no genótipo ARR/ARQ, com maior percentual de animais positivos que negativos. Observou-se que animais puros da raça Hampshire Down apresentaram maior freqüência do alelo ARR no grupo de animais negativos, ocorrendo o oposto nos animais mestiços, porém sem diferença estatística. As implicações dos resultados referentes ao polimorfismo do gene PrP em ovinos são discutidas no presente trabalho.

ABSTRACT

Scrapie is an infectious neurodegenerative fatal disease of sheep and goats that is characterized by changes in behaviour, trembling, ataxia, pruritis and weight loss. It is caused by accumulation of an abnormal isoform of the host-encoded cellular prion protein (PrP) in tissues of the central nervous system. Due to a long incubation period and still unknown transmission routes, its control is difficult. In sheep that have been exposed to the infectious agent of scrapie, the likelihood of progression to disease and the incubation period are very strongly linked to at least three polymorphisms in the PrP gene at codons 136, 154 and 171. Countries where scrapie is endemic have been using breeding programmes based on the selection for the most resistant alleles. Paraná is the State in Brazil where most of the cases of scrapie have been diagnosed. But there are no data about the polymorphism of PrP gene in sheep raised in this State. With the aim to study the polymorphism of the PrP gene, 325 sheep of meat breeds (Suffolk, Hampshire Down, Texel, Ile de France, Dorper, Dorset, Santa Inês and crossbreds) were genotyped. Two techniques, PCR-RFLP and automatic sequencing, were used to distinguish between the five alleles, considering the polymorphisms at codon 136 (alanine, A / valine, V), 154 (histidine, H / arginine, R) e 171 (histidine, H / glutamine, Q / arginina, R). The most frequent allele was ARQ, with a mean of 0,65, followed by ARR, with 0,30. VRQ and AHQ alleles had very low frequencies of 0,13 and 0,05. The ARH allele was not found. Seven genotypes were identified (ARR/ARR, ARR/ARQ, ARQ/ARQ; ARR/VRQ, ARR/AHQ, ARQ/VRQ e ARQ/AHQ) and the ARQ/ARQ was the most frequent (mean of 0,40). No animal was found with the VRQ/VRQ genotype, considered the most susceptible to scrapie. Santa Inês breed and the crossbred animals had the greatest variability. Among the studied flocks, one had clinical scrapie cases. All the animals of this flock were slaughtered (47 pure Hampshire Down and 71 crossbred) and had samples examined by immunohistochemistry. There were 15 positive animals, but none with the ARR/ARR genotype. In the pure breed animals, there were no differences between positive and negative groups of animals from different genotypes. In the crossbred animals there was a significant difference in the ARQ/ARQ genotypes, with no animals of this genotype being found as positive. There was also a significant difference in the ARR/ARQ genotype, with a greater percentage of positive animals within this genotype. It was seen a greater frequency of the ARR allele in the negative group of pure Hampshire animals, and the opposite been observed for the crossbreds. The implications of the data from these PrP gene polymorphisms are discussed in the present work.

1 INTRODUÇÃO

Scrapie ou Paraplexia Enzoótica é uma doença neurodegenerativa, progressiva e fatal de ovinos e caprinos, que ocorre de forma natural. Caracteriza-se por lesões de vacuolização no sistema nervoso central (SNC). Os principais sinais clínicos são irritação da pele, mudanças no comportamento, na postura, perda de peso, incoordenação motora e ataxia. Possui um longo período de incubação e suas vias de contaminação não estão completamente esclarecidas. É uma doença da lista B da OIE (Organização Mundial da Saúde Animal), portanto de notificação obrigatória.

O scrapie foi a primeira das encefalopatias espongiforme transmissíveis (EET) ou enfermidade priônica a ser descrita e comprovada, com o primeiro registro em 1732 na Grã Bretanha (McGOWAN, 1922). Na atualidade voltou a receber atenção, principalmente de países europeus, pela disseminação da Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) no Reino Unido (WELLS *et al.*, 1987). Porém, as preocupações com saúde pública somente vieram à tona após as primeiras associações entre EEB e a aparição de uma nova doença humana, denominada variante da Doença de Creutzfeldt-Jakob (vDCJ) (WILL *et al.*, 1996).

A confirmação de infecção experimental de ovinos e caprinos com o agente da EEB (FOSTER *et al.*, 1993, 1996) e o até agora único caso confirmado de infecção natural de EEB em um caprino (ELOIT *et al.*, 2005) fizeram com que os pequenos ruminantes, que anteriormente não eram assunto de saúde pública quando se tratavam de EETs, novamente tornassem a ser alvo de preocupações.

EGLIN *et al.* (2005) definem três grandes motivos para se controlar o scrapie na Grã-Bretanha e que levaram ao lançamento do *National Scrapie Plan* (NSP) (DEFRA, 2003): saúde pública, pela potencial presença de EEB em ovinos; saúde e bem estar animal, pelos animais doentes; questões econômicas, pelos custos e perdas em rebanhos contaminados e particularmente pelas restrições de comercialização e exportação.

DETWILER e BAYLIS (2003) citam os casos de muitos países que, nos últimos anos, continuam a relatar ausência de scrapie, porém sem nenhuma estratégia de vigilância disponível. Estes autores sugerem que algum tipo de vigilância ativa, como a que existe para EEB, deva ser exigido para certificação de

país livre de scrapie. E é exatamente esta uma das exigências que a OIE passou a adotar para considerar um país, região ou rebanho livre de scrapie: há que se fazer uma vigilância ativa (OIE, 2006a,b). Ou seja, atualmente, a ausência de diagnóstico de scrapie não é suficiente para considerar o país livre da doença. Uma procura exhaustiva deve ser feita, por meio da vigilância ativa, que examina animais saudáveis que são abatidos para consumo e também animais que morrem nas propriedades sem diagnóstico. Caso não sejam encontrados animais positivos após esta vigilância, torna-se possível afirmar que realmente não há a doença.

Programas de vigilância ativa são recentes, mesmo em países onde o scrapie é endêmico. Na Europa, a vigilância ativa iniciou em janeiro de 2002 (EUROPEAN COMMISSION, 2006) e nos Estados Unidos, dentro do Programa de Controle de Scrapie, o Sistema de Vigilância Ativa foi criado em abril de 2003 (APHIS, 2005).

Nestes países onde o scrapie é endêmico, programas de controle devem ser conduzidos de forma muito eficiente. Porém, o longo período de incubação e o conhecimento ainda limitado das vias de transmissão tornam o controle do scrapie bastante difícil (DAWSON, 2006). Outro fator agravante é a contaminação do ambiente, onde o agente pode permanecer pelo menos por mais de 3 anos infectivo (LEITA *et al.*, 2006; JOHNSON *et al.*, 2006). Os programas baseados em seleção de animais geneticamente resistentes ao scrapie ofereceram uma nova perspectiva nas estratégias de controle e foram a escolha destes países, principalmente em função de tantas outras tentativas frustradas de outros programas anteriores (BAYLIS, 2006).

A seleção de rebanhos (e plantas) tem sido a mais importante atividade agropecuária por centenas de milhares de anos. Os objetivos dessa seleção mudaram desde a domesticação. Docilidade foi provavelmente o primeiro objetivo de seleção, sendo que a produtividade tornou-se mais importante no último século, movendo-se para características funcionais e qualitativas nos últimos 20 anos. Os critérios e ferramentas para esta seleção também mudaram ao longo do tempo (abordagem empírica, maior uso da estatística e computação durante o século 20, aumento do uso de técnicas moleculares mais recentemente). Todavia, o objetivo dos cruzamentos sempre foi um equilíbrio entre ganhos em curto prazo, obtidos pela seleção vigorosa dos melhores animais, e pelos ganhos em longo prazo, somente possíveis se uma variabilidade genética é preservada através de manejo bastante

cuidadoso da diversidade, dentro e entre raças e linhagens. A Seleção Assistida por Marcadores e a Seleção Assistida por Genes, que mantêm uma crescente importância nos cruzamentos seletivos, não mudaram a natureza deste conflito curto/longo prazo, mas, sendo mais eficiente que os métodos anteriores, são mais susceptíveis a criar dificuldades se este equilíbrio curto/longo prazo não for cuidadosamente controlado. A seleção dos genótipos da proteína priônica (PrP) pertence a esta categoria de ações e esforços científicos têm sido feitos para ajudar nesse controle.

Desde os primeiros trabalhos (HUNTER *et al.*, 1989, BELT *et al.*, 1995; HUNTER *et al.*, 1997a,b) sugerindo que, para ovinos expostos à infecção pelo agente do scrapie, a variação alélica no locus da proteína priônica estaria associada ao risco de desenvolver a doença, países no mundo todo têm realizado a genotipagem de seus rebanhos. Há casos de países em que o scrapie é endêmico ou, muitas vezes, os trabalhos são realizados em países ou raças onde a doença nunca foi relatada. O objetivo comum é conhecer as frequências alélicas e genóticas do gene PrP em seus rebanhos. Em países onde há presença do scrapie, é possível estudar a associação dos genótipos, nas diferentes raças, com a presença da doença. Também é possível direcionar os cruzamentos, principalmente se já existem programas de controle do scrapie no país. Nos países onde a doença não está relatada, a genotipagem permite uma visualização do grau de susceptibilidade que aqueles rebanhos, ou raças, teriam caso o agente estivesse presente. Dessa forma é possível dimensionar a possibilidade de inclusão desta característica em futuros programas de seleção, que visem aumentar a resistência à doença, porém, sem perder ou prejudicar outras características produtivas.

EGLIN *et al.* (2005) destacam a importância da genotipagem das diferentes raças, ainda que em diferentes rebanhos possam existir muitas variações. Porém, o conhecimento das frequências genóticas seria útil de três maneiras: primeiro, para uma comparação de raças num contexto histórico; segundo, para prover um “marcador” para julgar o progresso de raças dentro de esquemas de controle como o NSP britânico; e, terceiro, para dar um indicativo do máximo melhoramento da distribuição das frequências que uma raça pode razoavelmente esperar adquirir.

O Brasil não tem a mesma preocupação com o scrapie, em função da baixa notificação da doença. Tampouco lhe concerne a questão da EEB, uma vez que não

há casos no Brasil (BRASIL, 1997). Mas, talvez seja exatamente por isso, que as autoridades devam ter uma especial atenção em relação a esta doença. A presença do scrapie, sem algum tipo de vigilância ativa ou controle específico, pode deixar uma fresta para especulações sobre possibilidade de EEB, além de restringir a questão de comercialização de animais, principalmente exportação de reprodutores.

Visando conhecer o polimorfismo do gene PrP em ovinos criados no Paraná e associar os diferentes genótipos encontrados à resistência ou susceptibilidade ao scrapie, este trabalho foi desenvolvido. Os objetivos específicos foram:

- Genotipar o gene PrP de ovinos de raças de corte criados no Estado do Paraná.
- Estimar as freqüências alélicas e genóticas do gene PrP de ovinos de raças de corte criados no Estado do Paraná.
- Comparar as freqüências encontradas com as descritas em outras populações de ovinos do mundo.
- Genotipar o gene PrP de ovinos de um rebanho potencialmente contaminado por scrapie.
- Correlacionar os genótipos e a presença da forma anormal da proteína priônica nesse rebanho potencialmente contaminado por scrapie.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISSÍVEIS

As Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET) são doenças degenerativas, de lenta progressão, invariavelmente fatais e que afetam o sistema nervoso central de vários mamíferos. Comum a todas as EETs é o acúmulo de uma forma patológica da proteína priônica (PrP) normal do hospedeiro (HUNTER, 1997). As EETs têm como característica longos períodos de incubação, assintomáticos, que podem durar meses ou anos (PRUSINER, 2004a).

Como encefalopatias humanas há a Doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ), Kuru, Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker e Insônia Familiar Fatal. As doenças em animais - Scrapie, Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB), Encefalopatia da Marta ou Vison, Encefalopatia Espongiforme Felina, a Doença Consumptiva (ou Debilitante) Crônica dos Cervos e Alces e a Encefalopatia Espongiforme dos Ruminantes Silvestres - completam a lista, formando o elenco de EETs. Por admitirem o prion como agente causal comum, são agrupadas sob a designação de Doenças Priônicas (PRUSINER, 1998).

As encefalopatias espongiformes constituem um tema de grande importância na atualidade devido à aparição de uma nova doença, denominada variante do Creutzfeldt-Jakob (vDCJ). Hoje há evidências suficientes de que a vDCJ é causada pelo agente da EEB e imagina-se que a transmissão desta doença dos bovinos aos humanos ocorreu por meio de infecção pelo agente da EEB na alimentação (WILL, 2006). Os primeiros casos da EEB ocorreram em vacas leiteiras suplementadas com proteínas de origem animal, contaminadas com o agente do scrapie, em 1985 (WELLS *et al.*, 1987).

WILL *et al.* (1996) relataram, no período de 1990 a 1996, 10 casos de DCJ na Grã-Bretanha, os quais apresentavam, além de algumas características clínico-patológicas incomuns quando comparadas com o padrão clássico, uma evidente correlação epidemiológica com a epizootia da EEB. Até abril de 2006, 161 casos de vDCJ haviam sido identificados na Grã-Bretanha. Ainda que as análises estatísticas tenham demonstrado que o número de casos está diminuindo, existe uma incerteza sobre o número total de casos futuros, devido a muitos fatores ainda desconhecidos,

incluindo o tempo médio de duração do período de incubação das EEB em humanos. Atualmente, a União Européia (UE) demonstra uma preocupação com a vDCJ devido à ocorrência de EEB e a identificação de bovinos afetados em países que previamente eram tidos como livres da doença. Na França já há registros de 17 casos de vDCJ, na Irlanda 4 casos, um caso na Itália e um no Canadá, dois casos nos Estados Unidos e recentemente foram reconhecidos casos únicos na Arábia Saudita, Japão, Holanda e Espanha (WILL, 2006).

No Brasil, os dados consolidados pelo Sistema de Informação de Mortalidade (SIM) do Ministério da Saúde, indicam que, no período de 1980 a 1999, ocorreram 105 óbitos atribuídos a DCJ. Por outro lado, não existem relatos sobre a ocorrência de casos de vDCJ no Brasil (ANVISA, 2004). Em 1997, através da Portaria Ministerial nº 516, o Brasil declarou-se livre de encefalopatia espongiforme bovina, de acordo com o que estabelece o Código Zoosanitário Internacional (BRASIL, 1997). O Governo Brasileiro já havia proibido, em 1996, o uso na alimentação de bovinos, ovinos e caprinos de proteína "in natura" e de farinhas de carne e de ossos provenientes de ruminantes (BRASIL, 1996). Porém, segundo o *Geographical BSE-Risk* (GBR) emitido pela UE, o Brasil está classificado como GBR II, ou seja, risco improvável, mas não excluído (EFSA, 2005).

No caso do scrapie, é importante lembrar que existe uma "barreira de espécie" que limita a transmissão das EETs entre organismos de diferentes espécies. Ainda que esta barreira possa ser atravessada, como ocorreu com a EEB, considera-se que o scrapie não afeta a espécie humana (DETWILER e BAYLIS, 2003; PRUSINER *et al.*, 2004). No entanto, é necessário um controle rigoroso da presença do scrapie para limitar ao máximo a possível disseminação do agente infeccioso. Da mesma forma, a possibilidade de que EEB possa ter infectado a população ovina no Reino Unido não pode ser descartada, de tal modo que a análise detalhada das EET no rebanho ovino supõe um assunto de grande interesse desde o ponto de vista de saúde animal e, principalmente, saúde pública (ESPINOSA *et al.*, 2004).

2.2 PRIONS

Prions são proteínas infecciosas (PRUSINER, 2004a). O termo “prion” denomina o agente infeccioso de uma série de doenças, caracterizadas por neurodegeneração espongiforme e proliferação de células da glia.

O conceito prion foi desenvolvido após muitas tentativas sem sucesso de decifrar a natureza do agente causador do scrapie. Inicialmente, muitos pesquisadores não aceitavam esta hipótese. Algumas características, como a resistência à inativação por formalina e tratamento térmico, usualmente utilizados na produção de vacinas virais, foram importantes pistas de que este agente deveria ser diferente dos vírus. Outra característica que confirmou sua natureza distinta à dos vírus foi sua extrema resistência a irradiações (PRUSINER, 2004b).

A transmissão do agente causador do scrapie de ovinos para camundongos permitiu uma série de estudos. À medida que dados reproduzíveis foram acumulados, indicando que a infectividade do scrapie poderia ser reduzida por meio de processos que hidrolisam ou modificam proteínas, mas continuava resistente a processos que alteram ácidos nucleicos, a hipótese sobre a arquitetura molecular do agente do scrapie começou a emergir. Foi então que PRUSINER (1982) estabeleceu, pela primeira vez, que uma macromolécula específica, uma proteína, era necessária para a infectividade. Propôs o termo “*prion*” (dos termos em inglês: ***proteinaceous*** e ***infectious***) para denotar estas pequenas partículas protéicas infecciosas, resistentes a tratamentos que modificam ácidos nucleicos. Uma vez que o requerimento de uma proteína foi estabelecido, era possível revisar a enorme lista de estruturas hipotéticas que foram propostas para o agente do scrapie e eliminar os carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos como os elementos infectivos. Porém, uma lista ainda grande de hipóteses permanecia (PRUSINER, 2004b). Quase imediatamente ao conceito de prion estabelecido por Prusiner, alguns pesquisadores redefiniram prion para significar uma partícula infecciosa composta exclusivamente de proteína (KIMBERLIN, 1982).

Logo depois, BOLTON *et al.* (1982), por meio de purificação de prions a partir de cérebro de hamster infectado com scrapie, identificaram uma proteína com massa molecular variando de 27 a 30 kDa. Esta proteína apresentou resistência a tratamento com proteinase K (PK), podendo ser detectada em cérebro de animais

infectados após digestão com esta enzima, mas não foi detectada em cérebro de animais sadios submetido ao mesmo tratamento. Sob ação da proteinase K, 67 aminoácidos da região N-terminal da proteína são degradados resultando na molécula que ficou conhecida como PrP 27-30, devido a variação de sua massa molecular. PrP 27-30 corresponde então à porção da proteína prion scrapie que é resistente a PK e capaz de manter infectividade (PRUSINER, 1998). Mais tarde, o gene para esta proteína foi identificado e sua seqüência não apresentou nenhuma diferença entre animais infectados e sadios (BASLER *et al.*, 1986). Esses dados mostram que a proteína priônica causadora do scrapie é codificada no genoma do próprio hospedeiro independentemente da doença e, portanto, sugere que eventos pós-traducionais seriam responsáveis pelas diferenças entre a isoforma celular e a isoforma relacionada à doença. À forma normal, não-causadora de doença, denominou-se PrP^C (PrP celular); a forma patogênica foi chamada de PrP^{Sc} (PrP Scrapie).

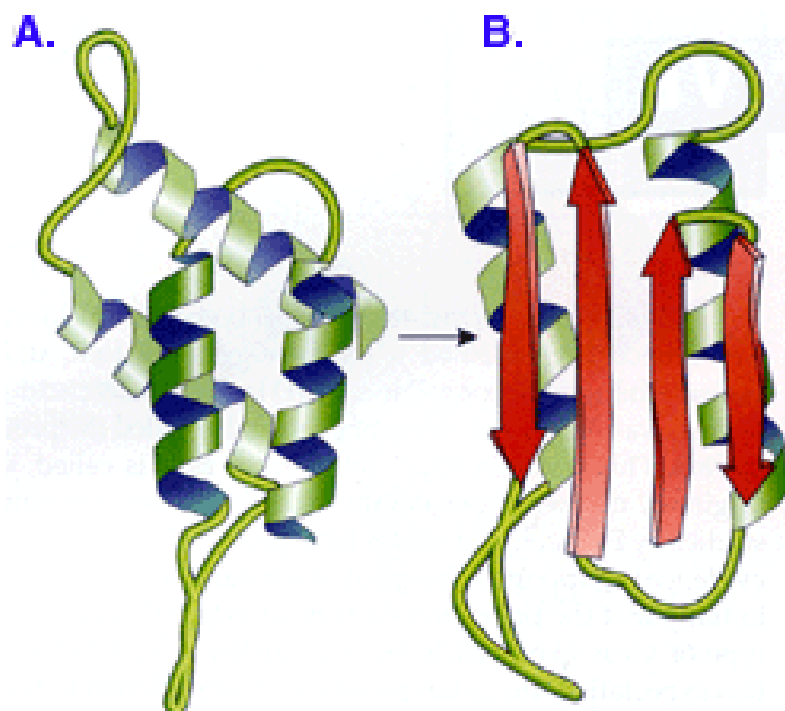
A proteína priônica consiste de aproximadamente 250 aminoácidos (dependendo da espécie), com cerca de 33-35 kDa; é glicosilada em um ou ambos os sítios de glicosilação e está presente na membrana externa das células, ancorada por glicofosfatidilinositol – GPI (HUNTER, 1997).

A isoforma normal, PrP^C, é rica em α hélices (42%) e possui pouca estrutura β folha (3%), enquanto a forma infecciosa, PrP^{Sc}, possui menos conteúdo em α hélices (17%) e maior porcentagem de estruturas em β folha (47%) (figura 1) (CAUGHEY *et al.*, 1991). Estes dados sugerem que a proteína prion celular (PrP^C) sofre alterações de estrutura secundária para se converter na isoforma infecciosa (PrP^{Sc}).

A estrutura rica em β folha possibilita que PrP^{Sc} forme agregados conhecidos como amilóide (PRUSINER, 1998). Além disso, PrP^{Sc} é insolúvel em detergentes e se acumula, ao contrário de PrP^C que recicla rapidamente (CAUGHEY *et al.*, 1991). Portanto, a forma patológica não é metabolizada corretamente e se acumula principalmente no sistema nervoso central e em tecidos linfóides. Esta forma patológica possui características diferentes da forma normal (quadro 1).

FIGURA 1 – Estrutura secundária das isoformas da proteína priônica.

- a) PrP^C com estruturas predominantes em α hélices
- b) PrP^{Sc} com estruturas predominantes em β folha



Fonte: disponível em www2.lifl.fr/~touzet/M1/TP1/tp1.html

Quanto à conversão da forma normal em patogênica, sabe-se que as duas isoformas de PrP apresentam a mesma sequência primária, sendo que a conversão de PrP^C para PrP^{Sc} representa uma alteração exclusivamente conformacional, onde uma interação física bastante específica deve ocorrer entre as duas isoformas para que haja propagação de PrP^{Sc} durante o processo de infecção (PRUSINER, 1998; HARRIS, 1999).

QUADRO 1 – Características da forma normal e anormal da proteína priônica (PrP)

	PrP normal	PrP anormal
Nomenclatura	PrP ^C	PrP ^{Sc}
Proteinase K (PK)	Sensível	Parcialmente resistente
Comprimento	~250 aminoácidos	~250 aminoácidos
Estrutura predominante	α hélices e <i>loops</i>	β folha
Glicosilada	Dois sítios	Dois sítios
Peso molecular (-PK)	33-35 kDa	33-35 kDa
Peso molecular (+PK)	Degradada	27-30 kDa
Localização	Superfície celular, ancorada por GPI	Fibrilas, deposita
Expressão	Muitos tecidos	Cérebro, SNC, linfonodos, baço, tonsilas
Expressão na doença	Níveis protéicos constantes	Níveis protéicos aumentam
<i>Turnover</i>	Rápido	Lento
Infectividade com scrapie	Não co-purifica	Co-purifica

Fonte: adaptado de HUNTER (1997).

Embora os sistemas de conversão *in vitro* reproduzam em parte o processo de propagação de prions, incluindo a especificidade entre espécies e cepas, estes são bastante ineficientes na produção de PrP^{Sc} e requerem um excesso de pelo menos 50 vezes mais PrP^{Sc} que PrP^C no início da reação, condição esta que é exatamente a oposta do que ocorre *in vivo* (HARRIS, 1999; CAUGHEY *et al.*, 1991). Além disso, PrP^{Sc} gerado *in vitro* não apresenta infectividade (HILL *et al.*, 1999; CAUGHEY *et al.*, 1991). Portanto, a possibilidade de co-fatores celulares serem necessários durante o processo de conversão não pode ser descartada (HARRIS, 1999).

O prion do scrapie é uma proteína hidrófoba, glicosilada, protease-resistente, com 27 a 30 kDa, constituída por uma única cadeia polipeptídica de 256

aminoácidos. O gene da PrP (PRNP) nos ovinos possui três éxons com 52, 98 e 4028 nucleotídeos, separados por 2 íntrons com 2421 e 14031 nucleotídeos. O quadro aberto de leitura da PrP está codificada por um único éxon (número 3). O PRNP é um gene cromossômico de cópia única, localizado no cromossomo 13, muito similar nas distintas espécies de mamíferos, apresentando uma homologia de sequência de 80 a 90% (LEE *et al.* 1998). Sua expressão é constitutiva em quase todos os tecidos do organismo adulto, sendo sua expressão máxima nos tecidos neuronais, fundamentalmente no cérebro, cerebelo, medula e hipotálamo.

De forma geral, todos os prions possuem características bastante diferentes dos agentes infecciosos convencionais (quadro 2).

QUADRO 2 – Propriedades do agente infeccioso das EETs (prion)

Longo período de incubação (meses, anos)
Não produzem resposta inflamatória
Não são antigênicos
Patologia crônica progressiva
Fatal em todos os casos
Presença de ácido nucléico não demonstrada
O único componente conhecido é a proteína PrP
Podem existir em múltiplas formas moleculares
Controle genético da susceptibilidade em algumas espécies
Existência de distintas cepas
Filtrável com poros de 25 nm
Invisível ao microscópio óptico e eletrônico
Resistente a: formaldeído, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), proteases (tripsina, pepsina), nucleases, radiação ultravioleta e radiação ionizante
Inativação com condições muito intensas: autoclave >134°C, 20 minutos; hipoclorito sódico 50%, hidróxido sódico 2N, fenol 90%

Fonte: adaptado de ESPINOSA *et al.* (2004).

2.3 SCRAPIE

O termo scrapie vem da palavra inglesa *scrape*, que tem o significado de raspar, arranhar ou esfolar. Apesar de ser conhecida desde o século 18 e dos recentes avanços na área de pesquisa, principalmente impulsionados pelo advento da EEB, muitos aspectos do scrapie ainda permanecem parcialmente ou totalmente desconhecidos. DETWILER e BAYLIS (2003) destacam que:

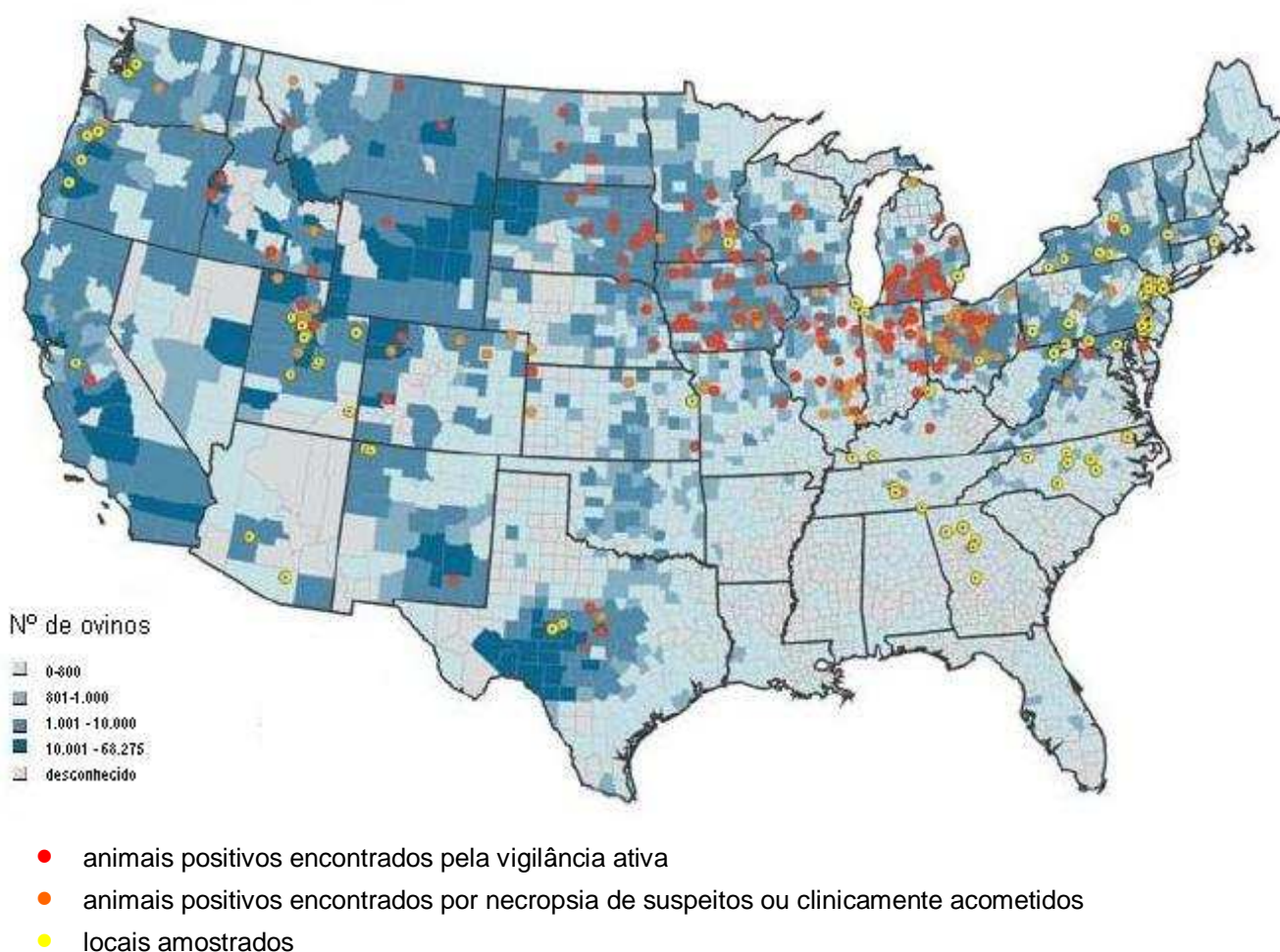
- a) o agente etiológico da doença ainda não foi totalmente caracterizado,
- b) a patogênese do scrapie não está totalmente entendida; um melhor conhecimento ajudaria a escolher tecidos alvo para fins diagnóstico, bloquear a progressão ou prevenir a doença;
- c) nem todas as vias de transmissão e sua importância relativa são conhecidas, o que poderia ajudar a prevenir a disseminação da doença e a avaliar o risco de contaminação de ambiente e produtos;
- d) ainda que o conhecimento na área de genética do hospedeiro influenciando a resistência/susceptibilidade ao scrapie tenha sido grandemente ampliado, informações essenciais ainda permanecem sem resposta, como: os genótipos que não apresentam evidências da doença clínica poderiam estar infectados e apresentar risco aos demais animais?; irá o agente se adaptar aos genótipos mais resistentes e se tornar um problema no futuro?;
- e) muitos avanços foram feitos nos testes diagnósticos, que permitem inclusive a confirmação em tecidos autolisados ou congelados e alguns testes têm apresentado os primeiros passos para o diagnóstico em animais vivos; porém, estas técnicas ainda não permitem o diagnóstico nos estágios mais iniciais da doença ou são extremamente difíceis em termos de logística;
- f) que métodos inativam totalmente o agente?;
- g) é o scrapie a fonte da EEB?

2.3.1 Epidemiologia

O scrapie nos ovinos é considerado uma doença endêmica em vários países da Europa, no Canadá e Estados Unidos, sendo relatada em diversos países do

Nos Estados Unidos, dentro do Programa de Controle de Scrapie, o Sistema de Vigilância Ativa foi criado em abril de 2003 (APHIS, 2005). Dados de 2003 até 2005 mostram que houve 370, 480 e 598 casos de scrapie nos anos de 2003, 2004 e 2005, respectivamente. O crescente número de diagnósticos positivos se deve em parte ao início do trabalho de vigilância ativa. Somente no ano de 2005, 30.247 ovinos e caprinos foram amostrados em 78 abatedouros diferentes, em 24 Estados norte-americanos. Foram encontrados 106 animais positivos (93 deles de raças cara-negra) no teste de imunohistoquímica (IHQ) do encéfalo, tecido linfóide ou ambos (APHIS, 2005). A figura 3 mostra os estados americanos e a localização de rebanhos positivos.

FIGURA 3 – Estados americanos e a localização de rebanhos positivos para scrapie no ano de 2005



Fonte: adaptado de APHIS (2005)

No Brasil, o primeiro relato de scrapie foi em 1978 em um ovino Hampshire Down, importado da Inglaterra (FERNANDES *et al.*, 1978). Em 1985, foi diagnosticado scrapie em ovinos importados do Reino Unido. Estes animais ainda estavam em período de quarentena e, na oportunidade, foram tomadas todas as medidas de emergência sanitária, entre estas a destruição de todos os animais doentes, seus descendentes e contatos. Nos últimos anos, segundo a OIE, o Brasil teve casos relatados de scrapie nos anos de 2000 (com 290 animais destruídos), 2001 (com 238 animais destruídos), 2003 (56 ovinos destruídos) e 2005 (75 animais destruídos) (dados disponíveis em <http://www.oie.int/hs2> e http://www.oie.int/wahid-prod/public.php?page=disease_status_detail). Há ainda casos que não constam na OIE, mas que estão publicados, como os casos de scrapie em ovinos da raça Suffolk no Rio Grande do Sul em 1995, 1996 e 1997 (RIBEIRO, 1996; DRIEMEIER, 2001). Aparentemente, foram notificados mais dois casos, sendo um em julho e outro em agosto de 2006, porém que também não constam na lista da OIE. Destes casos “oficiais”, os de 2000, 2001 e 2003 ocorreram em propriedades do Paraná. Desde o caso de 2003, considerado o primeiro caso autóctone do Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) vem trabalhando, inicialmente dentro do Programa Nacional de Sanidade de Ovinos e Caprinos (PNSCO) e posteriormente no Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros e Controle das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis, num programa específico de controle do scrapie (dados disponíveis em <http://www.mapa.br>).

O conhecimento da epidemiologia de uma doença é essencial para que seja possível delinear estratégias de controle. Porém, no caso do scrapie, a epidemiologia e particularmente os mecanismos de transmissão ainda não estão completamente entendidos (TOUZEAU *et al.*, 2006).

DETWILER e BAYLIS (2003) afirmam que a prevenção deve ser prioritária em países, regiões ou rebanhos onde o scrapie não está presente. A rápida eliminação da doença, imediatamente após a introdução, é uma estratégia essencial se as medidas preventivas não foram eficientes. Falhas na prevenção ou eliminação permitem uma disseminação silenciosa do prion durante seu longo período de incubação (meses ou anos). Para aqueles países ou regiões em que a doença se tornou endêmica, esforços para eliminá-la têm atravessado décadas e, na maioria dos casos, não têm tido sucesso. As características da doença são a causa primária

deste insucesso. Segundo BAYLIS (2006), a combinação de longo período de incubação e de muitas vias de transmissão, inclusive algumas ainda não bem conhecidas, faz com que as tentativas de controle do scrapie por interferência nas vias de transmissão sejam totalmente ineficientes.

2.3.2 Transmissão

A transmissão do scrapie ocorre em condições naturais (a doença é endêmica em muitos países do hemisfério norte), porém o modo de transmissão ainda não é totalmente conhecido (RYDER *et al.*, 2004). Durante muitos anos, presumiu-se que o scrapie era transmitido da mãe para o cordeiro, devido ao relativo alto risco de cordeiros se tornarem infectados se eles nascessem de mães afetadas, e reforçado pelos achados de infectividade da placenta e não de outras secreções ou excreções em animais acometidos (DETWILER e BAYLIS, 2003). Atualmente, aceita-se que é a herança da susceptibilidade vinda da mãe, e não uma transmissão materna, que levam a esta alta incidência (RYDER *et al.*, 2004). Portanto, a transmissão vertical até pode acontecer, mas é mais possível que a contaminação ocorra logo após o nascimento, e não no útero. ANDRÉOLETTI *et al.* (2002), trabalhando com cordeiros de genótipo VRQ/VRQ, considerado o mais susceptível, nascidos de mães com placentas contendo o prion ou não, mas mantidos no mesmo ambiente, observaram a mesma incidência da doença em ambos os grupo de cordeiros, indicando uma contaminação após o nascimento, mais que uma contaminação intra-uterina. Estes mesmos autores demonstraram que o acúmulo de prion anormal na placenta é controlado pelo polimorfismo do PRNP do cordeiro, uma vez que o acúmulo está restrito às células trofoblásticas do placentoma fetal.

RYDER *et al.* (2004) demonstraram, trabalhando com a introdução de ovinos adultos e livres de scrapie em rebanhos contaminados, que a transmissão lateral é a mais importante via de infecção em ovinos adultos e jovens. O mecanismo da infecção natural é ainda desconhecido. Sabe-se que a transmissão horizontal acontece pela via oral, uma vez que os primeiros locais onde se detecta a presença do prion, em animais naturalmente contaminados, é no trato digestivo, mais precisamente nas placas de Peyer (ANDRÉOLETTI *et al.*, 2000). A principal fonte de

contaminação do ambiente por tecidos infectivos é a placenta e os fluidos fetais, levando a um aumento na transmissão do scrapie durante a estação de nascimentos (ANDRÉOLETTI *et al.*, 2002, TOUZEAU *et al.*, 2006). Fluidos corporais como sangue, fezes, urina, sêmen e saliva são considerados como não contagiosos (DETWILER e BAYLIS, 2003).

Porém, CASTILLA *et al.* (2005), utilizando a tecnologia de *protein misfolding cyclic amplification*, conseguiram detectar, pela primeira vez, a proteína priônica no sangue de hamster com scrapie. FRANSCINI *et al.* (2006) desenvolveram uma técnica de adsorção específica e demonstraram a presença do prion celular (PrP^C) no leite de várias espécies, inclusive dos ovinos e caprinos (leite fresco de ovino e caprino contém cerca de 1 ng/ml e 40 pg/ml da PrP, respectivamente). Como existe relato de replicação do prion ocorrendo na glândula mamária de ovelhas com mastite (LIGIOS *et al.*, 2005) esta pode vir a ser mais uma via de transmissão.

Uma vez o ambiente contaminado, torna-se bastante complicada a eliminação do prion. LEITA *et al.* (2006) afirmam que existe uma forte interação da PrP^{Sc} com o solo, favorecendo seu acúmulo, especialmente se no solo forem colocados fertilizantes orgânicos ou quando carcaças de animais acometidos e placentas são enterradas ou deixadas na superfície do solo. JOHNSON *et al.* (2006) acrescentam que a PrP^{Sc} se liga fortemente ao solo e minerais, permanecendo pelo menos por mais de 3 anos infectivo. GEORGSSON *et al.* (2006) citam um caso ocorrido na Islândia, onde a investigação epidemiológica leva a concluir que o agente permaneceu viável por 16 anos.

2.3.3 Patogenia

Apesar dos mecanismos patológicos relacionados não estarem bem definidos, a deposição de PrP^{Sc} nos tecidos correlaciona com a infectividade e esta deposição é atualmente o único marcador molecular específico para as infecções das EETs (ANDRÉOLETTI *et al.*, 2000).

Em condições naturais, a infecção pelo agente do scrapie acontece após uma contaminação pela via oral. De forma geral, o esquema de disseminação ocorre da seguinte forma: logo após a infecção, o acúmulo da PrP^{Sc} torna-se detectável nas

placas de Peyer, onde a contaminação provavelmente acontece. Então a PrP^{Sc} dissemina-se progressivamente para todas as estruturas linfóides secundárias. Neste ponto de replicação, a infecção chega ao Sistema Nervoso Entérico (SNE), e invade o SNC, aparentemente através dos tratos nervosos autonômicos (ANDRÉOLETTI *et al.*, 2006b).

Este esquema de contaminação é o observado em ovinos com os genótipos mais susceptíveis. Entretanto, não correlaciona com dados obtidos em ovinos naturalmente afetados e heterozigotos para o alelo ARR (VAN KEULEN *et al.*, 1996); em alguns animais ARQ/VRQ (JEFFREY *et al.*, 2000) ou na EEB bovina (WELLS e WILESMITH, 2004). Em todos estes casos, nenhuma (ou quantidades muito pequenas) da PrP^{Sc} é detectada no tecido linfóide.

Conclui-se que o genótipo do hospedeiro tem importante papel na patogenia do prion. Em cordeiros VRQ/VRQ, considerado o genótipo mais susceptível ao scrapie, é possível detectar a presença de acúmulo de PrP^{Sc} nas placas de Peyer com apenas 2 meses de idade. Em seguida, ocorre a replicação no GALT: tecido linfóide associado ao intestino (*do termo em inglês: Gut-associated lymphoid tissues*), sendo a PrP^{Sc} detectável neste tecido entre os 3 e 6 meses de idade. A passagem do sistema linfóide para o Sistema Nervoso (SN) ocorre no nível das fibras nervosas que inervam estes tecidos linfóides, disseminando-se pelo SN Mesentérico Autonômico. Segue até o SNC através de um caminho axonal, o núcleo parassimpático do Nervo Vago, sendo aos 9 meses já possível a detecção da PrP^{Sc} neste tecido (ANDRÉOLETTI, *et al.*, 2000).

2.3.4 Sinais clínicos

Nos ovinos, a doença clínica se manifesta como uma desordem não febril, crônica, progressiva, neurodegenerativa e fatal. Os principais sinais clínicos que são relatados estão associados a uma irritação na pele, mudanças de comportamento, na postura e movimentação e perda de peso. Os sinais clínicos podem variar e alguns animais não apresentam um quadro típico (COCKCROFT e CLARK, 2006).

Segundo DICKINSON (1976), os sinais começam com uma modificação do comportamento social, seguido de incoordenação motora ou ataxia, com discretos tremores e grande prurido, o que leva os animais a se coçarem continuamente, esfregando-se em árvores, cercas ou mesmo mordendo as partes afetadas. As lesões ocasionadas pelo ato de se coçarem podem ser muito extensas, com grandes áreas de perda de lã. Apesar de o animal continuar se alimentando, há perda de peso progressiva.

LAMPERT *et al.* (1972) descrevem que nas primeiras fases, os animais somente apresentam ligeiras alterações do comportamento, mostrando-se nervosos, agressivos ou isolados do rebanho. Mais tarde começam a incoordenação motora (passadas altas nos membros anteriores e saltos de coelhos nos posteriores) e os tremores. Outros sinais podem incluir: déficit propioceptivo, bruxismo, tetraparesia, perda do reflexo de ameaça, nistagmos, vômitos, disfonia e timpanismo ruminal.

A duração dos sinais clínicos é muito variável, podendo ser de 2 semanas a 6 meses. Períodos de stress podem coincidir com o início dos sinais clínicos, ou exacerbar a severidade dos mesmos (COCKCROFT e CLARK, 2006).

O período de incubação é também bastante variável, de 1 a 7 anos (ESPINOSA *et al.*, 2004). Experimentalmente, o período de incubação varia de 1 a 4 anos (HUNTER, 1997). Atualmente, sabe-se que este período de incubação está diretamente relacionado ao genótipo do animal acometido, podendo variar de 174 dias para os animais VRQ/VRQ a 2150 dias em animais ARR/AHQ (HUNTER, 2006).

2.3.5 Diagnóstico

A detecção de PrP^{Sc} é o método mais específico, sensível e confiável para o diagnóstico da doença em qualquer animal (PRUSINER *et al.*, 2004). PrP^{Sc} somente é encontrada nas doenças priônicas e, assim, a sua presença em ovinos e caprinos é diagnóstica da infecção priônica. A histopatologia, por sua vez, pode ser bastante variável, com vacuolização da neurópila e astrogliose reativa variando consideravelmente na intensidade e localização.

Segundo JEFFREY (2006), os livros continuam a descrever as lesões histológicas de scrapie como vacuolização, astrocitose e perda neuronal, ainda que de fato nenhuma das três esteja invariavelmente presente nos casos clínicos de scrapie e que a perda neuronal seja raramente observada histologicamente. As alterações espongiformes da neurópila são comumente encontradas no scrapie clássico, mas a distribuição neuroanatômica da vacuolização na substância cinzenta e a proporção da vacuolização da neurópila e intra-neuronal são altamente variáveis. Alguns casos clínicos de scrapie podem demonstrar poucas evidências de vacuolização e, em algumas situações, não se detecta vacuolização no cérebro de animais clinicamente afetados (ERSDAL *et al.*, 2003).

A detecção da doença associada com acúmulo de proteína priônica pelas técnicas de imunoblotting ou imunohistoquímica (IHQ) é a forma mais confiável para demonstrar a presença da infecção. Há também evidências de que o acúmulo de PrP^{Sc} no tecido nervoso é prévio à neurodegeneração espongiforme (DeARMOND e PRUSINER, 1993; JEFFREY *et al.*, 2001), o que permite que estes métodos possam diagnosticar as ETTs antes do aparecimento de sinais clínicos e também nos casos em que as lesões neuropatológicas são mínimas ou ausentes. Ambos os métodos podem ser utilizados para identificar PrP anormal nos tecidos linfóides, no trato alimentar e nos sistemas nervoso periférico e autônomo. O grau em que tecidos periféricos estão envolvidos no scrapie clássico é influenciado pela dose, genótipo e cepa (JEFFREY, 2006).

Esses testes se baseiam no uso de anticorpos específicos, não necessariamente capazes de distinguir entre as duas isoformas de PrP. Portanto, previamente à detecção de PrP^{Sc} é necessário degradar a PrP^C, geralmente com proteinase K (PK). Estão sendo desenvolvidos alguns anticorpos que detectam epítomos específicos da PrP^{Sc}, possível pela alteração conformacional da proteína no momento de conversão da isoforma PrP^C para a PrP^{Sc}, expondo epítomos que na forma normal (celular) permanecem ocultos (PARAMITHIOTIS *et al.*, 2003).

A técnica de IHQ detecta a PrP^{Sc} *in situ*, permitindo determinar tanto a presença da proteína patológica como sua distribuição no tecido, sua localização celular e as características morfológicas do acúmulo (GONZÁLEZ *et al.*, 2003).

Um método imunohistoquímico especial, que utiliza anticorpos de diferentes especificidades, é utilizados para corar acúmulos intracelulares de PrP^{Sc} *in situ* e

pode discriminar entre EEB ovina e todas as outras cepas de scrapie dos ovinos ou fontes até agora testadas. Diferente dos roedores, cujas cepas de scrapie são conhecidas há tempo e onde o perfil de vacuolização pode ser utilizado com segurança para distinguir entre estas cepas, o perfil de vacuolização no caso dos ovinos é insuficientemente consistente para distinguir cepas (JEFFREY, 2006).

Como o agente das EETs não pode ser propagado *in vitro*, a única maneira de produzir grandes quantidades do agente para subseqüentes estudos é inocular material potencialmente infectante em receptores animais adequados. Linhagens consangüíneas de camundongos, com perfil de lesões e tempo de incubação pré-determinados, têm sido utilizadas para definir cepas de scrapie e para diferenciar scrapie de EEB, em transmissões em série. Porém, até 25% dos casos clássicos de scrapie não se consegue transmitir para camundongos (SPIROPOULOS, 2006).

LAUDE (2006) afirma que a transmissão do agente da EETs de uma espécie para outra é primeiramente controlada pela cepa do prion infectante e pela seqüência primária da proteína priônica normal (PrP^C) do hospedeiro recipiente. A expressão de um transgene codificando a PrP^C de uma outra espécie é um meio de reduzir a barreira de transmissão da referida espécie para o camundongo. Assim, várias linhagens de camundongos transgênicos que superexpressam seqüências heterólogas de PrP^C foram estabelecidas. Comparados com camundongos convencionais, estas linhagens têm demonstrado uma grande facilidade para transmissão experimental de prions de espécies naturalmente afetadas, inclusive homem, bovinos e ovinos. Linhagens de camundongos transgênicos para o alelo VRQ parece ser uma importante e promissora ferramenta na caracterização de cepas de scrapie.

O diagnóstico diferencial do scrapie deve ser feito com doenças que apresentam sinais neurológicos, prurido, ataxia, hiperestesia e emagrecimento (COCKCROFT e CLARK, 2006). Entre as principais, pode-se destacar: pneumonia progressiva ovina, listeriose, pseudo-raiva, raiva, ectoparasitos, toxinas, toxemia da gestação, poliencfalomalácia, envenenamento por chumbo, migrações parasitárias no SNC, abscessos cerebrais, Maedi-visna e deficiência de vitamina A (ESPINOSA *et al.*, 2004).

2.3.5.1 Diagnóstico pré-clínico

Os testes diagnósticos para EETs podem ser divididos em testes ante (e preferencialmente pré-clínico) e post-mortem. Todos os testes diagnósticos usados hoje em dia, baseiam-se na detecção da proteína priônica associada à doença. PrP^{Sc} pode ser detectada no SNC de bovinos em um tempo próximo à doença clínica, mas bem antes em ovinos e caprinos, ainda no período de incubação. Dependendo do genótipo, a PrP^{Sc} pode também ser detectado fora do SNC. Portanto, um diagnóstico pré-clínico pode ser realizado em ovinos e caprinos, mas não em bovinos (GROSCHUP, 2006).

A biópsia da terceira pálpebra foi o primeiro passo para um possível diagnóstico pré-clínico, não invasivo, em ovinos (O'ROURKE *et al.*, 1998a, 2000). O tecido linfóide presente nesta região é facilmente retirado para biópsia, sob anestesia local.

Segundo GONZÁLEZ (2006), o diagnóstico em animais vivos, assintomáticos, está restrito a biópsias de tonsila palatina ou terceira pálpebra, mas que exigem procedimentos pouco práticos de serem realizados a campo. Porém, mais recentemente, tem sido testada a técnica de diagnóstico pré-clínico em amostras da mucosa retal, por meio de provas imunohistoquímicas da presença de PrP^{Sc} no tecido linfóide associado à mucosa retoanal (GONZÁLEZ *et al.* 2005; ESPENES *et al.*, 2006). Em animais com diagnóstico positivo por IHQ no SNC ou em outros tecidos linforreticulares, o método apresentou 97,0% de sensibilidade, não detectando apenas aqueles animais cuja IHQ era positiva para SNC e não para os outros tecidos linfóides. Em 100% dos casos negativos para os outros órgãos ou tecidos, a IHQ da mucosa retal também foi negativa (GONZÁLEZ *et al.* 2005).

Nos ovinos de genótipo mais susceptível, naturalmente infectados, a PrP^{Sc} foi inicialmente detectada na mucosa em aproximadamente metade do período de incubação. A técnica também apresentou resultados positivos para animais experimentalmente infectados, tanto com scrapie quanto EEB, independente da via de infecção. Após certo treinamento, a técnica é rápida e simples de ser feita, não necessitando anestesia ou sedação, podendo ser repetida várias vezes durante a vida do animal (GONZALEZ, 2006).

2.3.6 Scrapie atípico

Um novo tipo de scrapie, denominado Nor98, foi diagnosticado na Noruega pela primeira vez em 1998 (BENESTAD *et al.*, 2003). Provavelmente representa o maior grupo de casos “atípicos” de scrapie, relatados em vários países europeus. O Nor98 difere claramente do scrapie clássico em muitos aspectos e desafia o diagnóstico do scrapie. Os casos do Nor98 têm menor quantidade e menos PrP^{Sc} PK-resistente no tecido encefálico que os casos de scrapie clássico. Essas características poderiam explicar, pelo menos parcialmente, o porquê de alguns testes rápidos apresentarem problemas em detectar a maioria dos casos de Nor98 (BENESTAD *et al.*, 2006).

Os casos atípicos, primeiramente identificados na Noruega (BENESTAD *et al.*, 2003; MOUM *et al.* 2005), após a implantação de vigilância ativa de EETs também foram identificados em outros países: França e Alemanha (BUSCHMANN *et al.*, 2004a), Suécia (GAVIER-WIDEN *et al.*, 2004), Portugal (ORGE *et al.*, 2004), Irlanda (ONNASCH *et al.*, 2004), Bélgica (De BOSSCHERE *et al.*, 2004), Reino Unido (SAUNDERS *et al.*, 2006) e Ilhas Malvinas (EPSTEIN *et al.*, 2005).

São muitas as diferenças entre os casos atípicos designados Nor98 e os casos clássicos, que incluem diferenças na distribuição neuroanatômica das lesões histopatológicas e da PrP^{Sc} no encéfalo e no padrão de deposição da PrP^{Sc}. A distinção entre os dois tipos se baseia nestas características e é confirmada pela observação do perfil eletroforético da Nor 98 no Western blot, caracterizado por uma rápida migração de uma banda de aproximadamente 12 KDa (BENESTAD *et al.*, 2003).

Clinicamente, nos casos atípicos os sinais mais comuns são ataxia e incoordenação, ansiedade e mudança de comportamento, e perda de peso. O prurido, bastante comum nos casos clássicos de scrapie, não é observado, mas os sinais podem ser vagos ou ausentes (BENESTAD *et al.*, 2006). O aparecimento dos sinais clínicos em geral está em torno de 6 anos, variando de 36 a 100 meses de idade (MOUM *et al.*, 2005).

As mudanças histopatológicas e a coloração imunohistoquímica no encéfalo não estão presentes nas áreas de referência para o scrapie clássico, que seriam a região do óbex da medula oblonga, e especialmente o Núcleo Motor Dorsal do

Nervo Vago. Quando presente, a vacuolização e a coloração da IHQ são mais pronunciadas no córtex cerebelar e cerebral, indicando que amostras do cerebelo, em adição à área do óbex, são essenciais para o diagnóstico dos casos de scrapie Nor98 (BENESTAD *et al.*, 2006).

A distribuição dos genótipos PrP nos casos atípicos também difere. O códon 141 (Leucina, L/ Fenilalanina, F) está associado aos casos de Nor98. MOUM *et al.* (2005) encontraram uma forte associação entre a presença dos casos atípicos e os alelos AF₁₄₁RQ e AHQ. Pelo menos um desses alelos, ou ambos, estavam presentes em 36 dos 38 casos analisados. Os outros dois casos eram ARQ/ARQ. Em contrapartida, nenhum animal carregando alelo VRQ foi identificado com scrapie atípico, ainda que presente na população estudada com uma frequência alélica de 12,5%, sugerindo que este alelo confere resistência ao scrapie Nor98. SAUNDERS *et al.* (2006) analisando os casos atípicos do Reino Unido, concluem que animais carregando qualquer combinação homo ou heterozigota dos alelos ARR, AHQ e AF₁₄₁RQ, ou qualquer destes alelos quando em conjunto com ARQ, são susceptíveis ao scrapie atípico. Animais heterozigotos ou homozigotos para VRQ, ou homozigotos para ARQ são susceptíveis ao scrapie clássico. O alelo AHQ foi associado com o maior risco de incidência ao scrapie atípico (263 por 100.000 alelos), enquanto o alelo VRQ foi associado com a menor incidência (10 por 100.000 alelos).

A presença esporádica de casos únicos de scrapie atípico nos rebanhos, sem prévio contato, levou à especulação de que estes casos atípicos, apesar do scrapie ser considerado como uma doença infecciosa, pudessem ser espontâneos, como acontece na DCJ esporádica em humanos (BENESTAD *et al.*, 2003; NÖREMARK, 2006).

2.4 ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME BOVINA EM OVINOS

A epidemia de EEB, iniciada em 1986 e com o pico em 1992, resultou em torno de 185.000 bovinos clinicamente e fatalmente acometidos. Aproximadamente 3 milhões de animais infectados que ainda estavam na fase pré-clínica foram abatidos e entraram na cadeia alimentar humana no Reino Unido e em outras

localidades. A transmissão do EEB para o homem causou a vDCJ em mais de 170 pessoas no Reino Unido, mas também na França, Itália, Japão e outros lugares. Como uma medida preventiva na União Européia, o risco de exposição humana ao EEB é minimizado pelo teste rápido de todo o bovino com mais de 30 meses de idade e pela remoção dos materiais de risco específico da carcaça de animais que são considerados como possivelmente possuindo infectividade para EEB (GROSHUP, 2006).

Durante os anos 80, farinha de carne e ossos (MBM - *meat and bone meal*) contaminada com EEB foi fornecida para ovinos, levantando a possibilidade da EEB ter sido transmitida para o rebanho ovino britânico e, então, tornando-se um risco potencial para a saúde humana. Preocupações posteriores foram levantadas quando EEB foi experimentalmente transmitida para ovinos pelo desafio oral de apenas 0,5 g de material cerebral bovino contaminado (STACK, 2006).

BELLWORTHY *et al.* (2005) demonstraram experimentalmente que, em animais de genótipo ARQ/ARQ, a doença já podia ser identificada 4 meses após a dose oral nos linfonodos retrofaríngeos e nas placas de Peyer e, aos 10 meses, a infecção já estava disseminada pela carcaça. Os sinais clínicos foram observados entre 628 e 1132 dias. No SNC, o padrão de disseminação da PrP^{Sc} e a vacuolização eram similares ao scrapie. A doença induzida pela infecção experimental foi indistinguível do scrapie.

Exames que podem diferenciar o scrapie de EEB são: western immunoblotting; ELISA; imunohistoquímica (JEFFREY *et al.*, 2001; GONZÁLEZ *et al.*, 2003). Existe desde 2001, uma regulamentação da União Européia que determina que todo o animal positivo para scrapie tem que ser testado para EEB (EU, 2001). Até o momento, existem registros de 2 ovinos suspeitos e um caprino confirmado de contaminação natural por EEB (ELOIT *et al.*, 2005).

2.5 O PAPEL DA GENÉTICA NA EPIDEMIOLOGIA E PATOGENIA DO SCRAPIE

O scrapie em ovinos é uma doença infecciosa, na qual a susceptibilidade genética tem um papel importante (GOLDMANN *et al.* 1990; HUNTER *et al.* 1997a,b). A primeira publicação indicando que o genótipo da PrP poderia estar

relacionado à resistência ou susceptibilidade dos ovinos ao scrapie foi em 1989 (HUNTER *et al.*, 1989). Nos 17 anos subseqüentes a este primeiro relato de 30 ovinos, dezenas de milhares de animais já foram genotipados. Somente o *National Scrapie Plan* (NSP) da Grã Bretanha genotipou mais de um milhão de ovinos. O processo de seleção de animais resistentes ao scrapie que vem sendo aplicado em toda a Europa é sem precedentes, tanto em tamanho quanto em efeitos. Em conjunto com a análise da deposição da proteína PrP^{Sc} no tecido encefálico, este grande “experimento” está produzindo novas e importantes informações sobre o gene PrP e sobre os genótipos dos ovinos que aparentemente são capazes de suportar uma infecção (HUNTER, 2006).

Polimorfismos nos códons 136, 154 e 171 são os parâmetros determinantes (BELT *et al.*, 1995; HUNTER *et al.* 1996, 1997a,b). Porém, até o presente momento, 26 polimorfismos confirmados (tabela 1) e outros não confirmados já foram descritos para a seqüência de aminoácidos da PrP em ovinos (GOLDMANN *et al.*, 1990; GOLDMANN *et al.*, 1991; LAPLANCHE *et al.*, 1993; BELT *et al.*, 1995; CLOUSCARD *et al.*, 1995; BOSSERS *et al.*, 1996; THORGEIRSDOTTIR *et al.*, 1999; TRANULIS *et al.*, 1999; O'ROURKE *et al.*, 1996; DeSILVA *et al.*, 2003; GOMBOJAV *et al.*, 2003; GUO *et al.*, 2003; SEABURY e DERR, 2003; BILLINIS *et al.*, 2004).

Levando em conta os códons 136, 154 e 171, respectivamente, a variante ARQ é considerada como o alelo ancestral porque a maioria das variações da proteína PrP poderia ter derivado de uma única mutação de ponto na seqüência ARQ (EFSA, 2006). Entre as possíveis combinações dos aminoácidos nestes três principais códons, apenas cinco são normalmente encontradas nos ovinos. Os alelos são ARR; ARQ; ARH; AHQ; VRQ, cujos pareamentos em homo ou heterozigose, geram 15 genótipos possíveis (BELT *et al.*, 1995; DAWSON *et al.*, 1998).

É difícil discutir as vantagens genéticas destes polimorfismos na ausência de uma peça central de informação: a função biológica verdadeira do PrP e o efeito destes polimorfismos na sua função. Porém, está claro que a susceptibilidade do genótipo ARR/ARR aos agentes causadores do scrapie clássico atualmente circulantes é extremamente baixa, senão nula (HUNTER, *et al.*, 1997a; ELSESEN *et al.*, 1999; THORGEIRSDOTTIR *et al.*, 1999; TRANULIS *et al.*, 1999; ACÍN *et al.*, 2004; BILLINIS *et al.*, 2004). Com exceção de um animal da raça Suffolk no Japão

(IKEDA *et al.*, 1995), e que posteriormente não foi confirmado, não há um único caso de infecção natural de uma animal homozigoto ARR. Entretanto, a recente identificação em animais ARR/ARR de: a) acúmulo atípico de PrP anormal (scrapie atípico) em ovinos (BUSCHMANN, *et al.*, 2004b; LeDUR *et al.*, 2005) e b) transmissão a ovinos de EEB após desafio intracerebral (HOUSTON *et al.*, 2003) e desafio oral (ANDRÉOLETTI *et al.*, 2006a), indicam que a resistência deste genótipo às EETs não é absoluta.

TABELA 1 – Polimorfismos confirmados do gene PrP encontrados em ovinos

Códon	Aminoácido da proteína PrP selvagem	Aminoácido da proteína PrP variante
112	Metionina – M	Treonina - T
116	Alanina – A	Prolina – P
127	Glicina – G	A; Valina – V; Serina – S
136	A	V; T
137	M	T
138	S	Asparagina – N
141	Leucina – L	Fenilalanina – F
143	Histidina – H	Arginina – R
151	R	Cisteína – C
154	R	H
167	R	S
171	Glutamina – Q	R; H; Lisina – K
176	N	K
180	H	Tirosina – Y
189	G	L; R
195	T	S
196	T	S
211	R	Q
241	P	S

Fonte: adaptado de EFSA (2006).

Por outro lado, o alelo VRQ é considerado como associado à alta susceptibilidade às EETs em ovinos, na maioria dos agentes até então identificados como circulantes atualmente (ELSEN *et al.*, 1999; THORGEIRSDOTTIR *et al.*, 1999; TRANULIS *et al.*, 1999; ACÍN *et al.*, 2004; BILLINIS *et al.*, 2004). Porém, para a EEB, uma baixa susceptibilidade dos portadores de alelo VRQ pode ser observada (FOSTER *et al.*, 2001).

A combinação dos demais alelos apresenta resistência/susceptibilidade intermediárias e variáveis. DAWSON *et al.* (1998) foram os primeiros a propor uma classificação para as diferentes combinações alélicas, agrupando os genótipos em 5 grupos, sendo o R1 o mais resistente e o R5 o mais susceptível (tabela 2).

TABELA 2 – Classificação dos diferentes genótipos encontrados em ovinos, em raças onde os 5 alelos estão presentes, quanto à resistência/susceptibilidade ao scrapie

Grupo	Genótipos do PrP
R1	ARR/ARR
R2	AHQ/AHQ; ARR/AHQ
R3	ARQ/AHQ; AHQ/ARH, ARR/ARH; ARR/ARQ
R4	AHQ/VRQ; ARR/VRQ; ARQ/ARQ; ARQ/ARH; ARH/ARH
R5	VRQ/VRQ; ARQ/VRQ; ARH/VRQ

Fonte: DAWSON *et al.* (1998).

Obs.: grupo R1 indica a menor susceptibilidade ao scrapie, que vai aumentando até chegar ao grupo 5, que tem a maior susceptibilidade.

A forma como o polimorfismo atua no risco do aparecimento da doença não é bem conhecida. Sabe-se que a conversão da forma normal da proteína do hospedeiro, PrP^C, para a forma anormal e patogênica, PrP^{Sc}, é fundamental para o processo da doença, e pode ser que a taxa de conversão das duas formas seja alelo dependente. Assim, em ovinos, a proteína produzida pelo alelo ligado à mais alta incidência de scrapie, o VRQ, pode converter mais facilmente à forma PrP^{Sc} e resultar num relativamente rápido aparecimento da doença. Em contraste, os outros alelos que são menos associados com a doença ou que apresentam períodos mais

longos de sobrevivência deve produzir PrP^C que converte menos facilmente, enquanto que o alelo associados fortemente à resistência, o ARR, pode produzir uma forma de PrP^C que não se converte ou o faz com extrema dificuldade (HUNTER, 1997).

A influência do genótipo PrP na resistência ou susceptibilidade ao scrapie pode variar entre rebanhos e raças de ovinos (DAWSON *et al.*, 1998) e ainda depende da cepa do scrapie (GOLDMAN *et al.*, 1994; DAWSON *et al.*, 1998). Por exemplo, o alelo ARQ é considerado altamente susceptível às EETs em geral (inclusive à infecção experimental por EEB); porém em um isolado em particular, tipo SSBP-1, torna-se impossível propagá-lo em animais ARQ/ARQ (GOLDMANN *et al.*, 1994). BAYLIS *et al.* (2004) e O'DOHERTY *et al.* (2002), analisando risco de determinado genótipo estar associado ao scrapie, encontram valores bastante diferentes para a presença dos alelos AHQ e ARQ.

Quanto às raças, relatos de diferentes países, principalmente europeus e, muitas vezes, incluindo raças nativas, têm sido publicados. O objetivo destes trabalhos é conhecer a variabilidade do gene PrP presente nos seus rebanhos, a fim de servir como base para possíveis programas de seleção de animais geneticamente mais resistentes. Mesmo países sem casos de scrapie têm genotipado seus rebanhos (LAN *et al.*, 2006; BOSSERS *et al.*, 1999).

Há dados de rebanhos genotipados na Áustria (SIPOS *et al.*, 2002), Alemanha (JUNGHANS *et al.*, 1998; KUTZER *et al.*, 2002), China (LAN *et al.*, 2006), Espanha (HURTADO *et al.*, 2002; ACÍN *et al.*, 2004; MOLINA *et al.*, 2006), Estados Unidos (WESTAWAY *et al.*, 1994; O'ROURKE *et al.*, 1996; DeSILVA *et al.*, 2003); França (ELSEN *et al.*, 1999); Holanda (BELT *et al.*, 1995); Itália (VACCARI *et al.*, 2001), Irlanda (O'DOHERTY *et al.*, 2000; 2001), Islândia (THORGEIRSDOTTIR *et al.*, 1999); Grécia (BILLINIS *et al.*, 2004); Portugal (GAMA *et al.*, 2006), Grã Bretanha (HUNTER *et al.*, 1997a,b; TONGUE *et al.*, 2004, 2005; EGLIN *et al.*, 2005; TOWNSEND *et al.*, 2005), Nova Zelândia (BOSSERS *et al.*, 1999).

Nestes países, vários métodos para a determinação do genótipo PrP têm sido utilizados. Os mais comuns são o seqüenciamento convencional de produtos de PCR (SIPOS *et al.*, 2002; THORGEIRSDOTTIR *et al.*, 1999), análise de cada códon pelo *primer extension assay* (VACCARI *et al.*, 2004); hibridação de oligonucleotídeos

(HUNTER *et al.*, 1997b) e PCR-RFLP (ELSEN *et al.*, 1999; ACÍN *et al.*, 2004; LÜHKEN *et al.*, 2004).

Outros métodos, mais recentes e menos difundidos ainda, podem ser utilizados, como o *PCR-single-strand conformational polymorphism analysis* (ZHOU *et al.*, 2005) e *PCR with Melting Curve Analysis*, utilizando o método *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) (SCHUTZ *et al.*, 2006).

2.6 PLANOS NACIONAIS DE CONTROLE DO SCRAPIE

Além do conhecimento ainda limitado das vias de transmissão e, até recentemente, sem testes laboratoriais que pudessem dar suporte ao diagnóstico *ante-mortem*, o controle do scrapie torna-se bastante difícil. Exatamente por isso que a possibilidade de genotipagem do rebanho ovino, surgida na década de noventa e associando genótipos ao risco clínico de scrapie, ofereceu uma nova perspectiva nas estratégias de controle (DAWSON, 2006).

Na Grã-Bretanha, o serviço de genotipagem comercial dos rebanhos ovinos está disponível desde 1994. Desde então, em muitos rebanhos foi iniciado um programa de controle baseado na genotipagem e descarte seletivo dos genótipos mais susceptíveis e com maiores risco de desenvolver a doença clinicamente. Porém, foi após o descobrimento do vDCJ (WILL *et al.*, 1996) e da evidência de que a EEB poderia ser experimentalmente transmitida para ovinos pela via oral (FOSTER *et al.*, 1993; BELLWORTHY *et al.*, 2005) que o Comitê de Encefalopatias Espongiformes recomendou um programa nacional de controle, baseado na genotipagem do gene PrP. Assim, em 2001 foi lançado o *National Scrapie Plan* (NSP) (disponível em <http://www.defra.gov.uk>) para rebanhos de raças puras registradas e que foi estendido para os rebanhos de raças puras não registradas em 2002 (RODEN *et al.*, 2006). O programa, que é voluntário, atualmente tem como base o *Ram Genotyping Scheme* (RGS), baseado na seleção positiva de reprodutores com alelo ARR e na seleção negativa para o VRQ. Aproximadamente 600.000 carneiros já foram genotipados em 12.000 rebanhos (DAWSON, 2006). O programa apresenta uma tabela que serve de guia para as restrições de utilização em cruzamentos, de acordo com o genótipo dos animais (tabela 3). Paralelamente,

existe um programa de estocagem de sêmen congelado de carneiros com alelos AHQ, ARH, ARQ e VRQ, como uma contingência contra futura necessidade de reintroduzir estes alelos na população (EHLING *et al.*, 2006). Existe também o *Ewe Genotyping Service* (EGS), disponíveis para os criadores que já são membros do RGS, e que seleciona as ovelhas.

TABELA 3 – Classificação dos diferentes genótipos encontrados em ovinos quanto ao grau de resistência/susceptibilidade ao scrapie, segundo o *Ram Genotyping Scheme* do NSP

Tipo	Genótipos	Grau de resistência/susceptibilidade
1	ARR/ARR	Ovinos que são geneticamente mais resistentes ao scrapie
2	ARR/AHQ ARR/ARH ARR/ARQ	Ovinos que são geneticamente resistentes ao scrapie, mas que necessitam de seleção cuidadosa quando utilizados para cruzamentos
3	AHQ/AHQ AHQ/ARH AHQ/ARQ ARH/ARH ARH/ARQ ARQ/ARQ	Ovinos que geneticamente têm pouca resistência ao scrapie e que necessitam de seleção cuidadosa quando utilizados para cruzamentos
4	ARR/VRQ	Ovinos que são geneticamente susceptíveis ao scrapie e que não devem ser utilizados para reprodução, exceto dentro de um programa controlado de reprodução aprovado pelo NSPAC*
5	AHQ/VRQ ARH/VRQ ARQ/VRQ VRQ/VRQ	Ovinos que são geneticamente muito susceptíveis ao scrapie e que não devem ser utilizados para reprodução

NSPAC* - National Scrapie Plan Administration Centre

Fonte: adaptado do NSP Genotypes Table - DEFRA (disponível em:

<http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/othertses/scrapie/nsp/publicatsrpts/tables.htm>)

Segundo DAWSON (2006), após a implantação do NSP, foi possível conseguir menor risco da doença nas progênes, confiança nas vendas e valorização dos preços. Observou-se também uma redução de casos notificados de scrapie, que caíram de 550 em 2000 para 260 em 2005, mesmo levando em conta que houve um aumento na porcentagem de notificações (em 1995, estima-se que 30% dos criadores notificavam os casos de scrapie e, em 2002, este número aumentou para 40%).

Atualmente existe também uma legislação que impõe uma ação compulsória em rebanhos com scrapie, baseada predominantemente na genotipagem e descarte seletivo, além da restrição de deslocamento dos animais (DAWSON, 2006).

Além de programas específicos de cada país, desde 1º de abril de 2005 existe uma decisão da União Européia que lançou um programa de cruzamentos para todos os países membros (EU, 2003). Este programa inclui requerimentos compulsórios mínimos para todos os rebanhos de alto mérito genético. Os objetivos do programa são aumentar a frequência do alelo ARR e reduzir a frequência de alelos que tenham sido identificados como susceptíveis às ETTs. Para tanto, os animais são identificados e genotipados antes de serem usados na reprodução, excluindo machos que carreguem um alelo VRQ. Existe a proibição para fêmeas VRQ de sair da propriedade, exceto para abate. Assim como o NSP, vários países aplicam regras mais rígidas, como exclusão de ovinos ARQ/ARQ para reprodução, ou estendendo essas regras também para outros tipos de rebanho e não somente para os de “alto mérito genético”.

Nos Estados Unidos, o Serviço de Inspeção Sanitária Animal e Vegetal do Departamento de Agricultura (Department of Agriculture's – USDA – Animal Plant Health Inspection Service – APHIS) está usando a genotipagem para determinar quais os animais que, após terem sido expostos à infecção por scrapie, devem ser removidos ou restrito aos rebanhos afetados e quais estão livres para deslocamentos de forma irrestrita. São reconhecidos como importantes os códons 171 e 136 na determinação da susceptibilidade ao scrapie nos EUA (APHIS, 2005) (tabela 4).

O plano americano, denominado *The National Genetics Based Flock Clean-up Plan* permite que criadores com rebanhos afetados permaneçam ou desloquem ovinos classificados como RR₁₇₁; AA₁₃₆ QR₁₇₁ e a maioria dos AV₁₃₆ QR₁₇₁ de forma

irrestrita. Também há que se remover ou restringir todas as ovelhas QQ expostas, cabras expostas e os descendentes de ovelhas acometidas por scrapie (disponível no endereço <http://www.aphis.usda.gov/vs/nahps/scrapie>).

TABELA 4 – Classificação dos diferentes genótipos encontrados em ovinos quanto ao grau de resistência/susceptibilidade ao scrapie, segundo o *The National Genetics Based Flock Clean-up Plan* nos EUA

Genótipos	Grau de resistência/susceptibilidade
AA ₁₃₆ RR ₁₇₁	Ovinos que são quase completamente resistentes ao scrapie. Estes animais são altamente improváveis de carregar ou transmitir o scrapie.
AA ₁₃₆ QR ₁₇₁	Ovinos que são raramente susceptíveis ao scrapie. Não se sabe se animais deste genótipo infectados podem transmitir a doença. O risco a partir destes animais é provavelmente menor, uma vez que animais AA ₁₃₆ QR ₁₇₁ , quando infectados, raramente apresentam PrP anormal fora do encéfalo.
AV ₁₃₆ QR ₁₇₁	Ovinos que são susceptíveis a algumas cepas de scrapie. Somente dois casos foram identificados nos EUA. O risco a partir destes animais é provavelmente menor, uma vez que animais AV ₁₃₆ QR ₁₇₁ , quando infectados, raramente apresentam PrP anormal fora do encéfalo.
QQ ₁₇₁	Ovinos que são muito susceptíveis ao scrapie e que podem transmitir a doença a outros rebanhos susceptíveis.

Fonte: adaptado de APHIS (2005)

disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/vs/nahps/scrapie>

Em geral, os planos e programas seletivos de cruzamentos, quer com maior ou menor pressão de seleção, visam aumentar a frequência alélica do alelo ARR e diminuir a do VRQ. Algumas preocupações vêm sendo levantadas pela comunidade

científica, quanto aos possíveis efeitos destes tipos de programas (BISHOP, 2006; ROUGHSEEDGE *et al.*, 2006; EFSA, 2006), destacando-se:

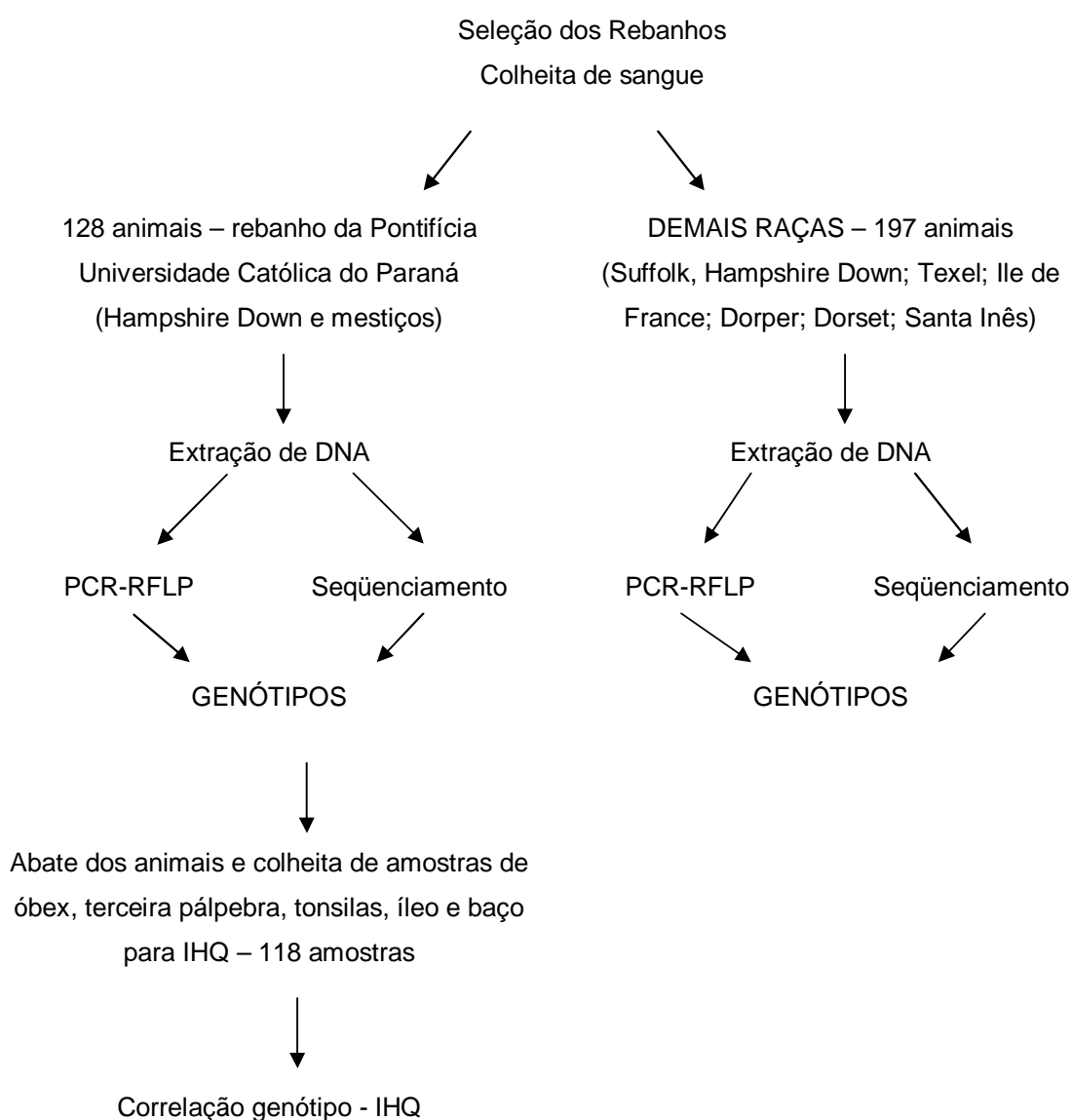
- possíveis efeitos adversos na resistência a outras doenças;
- risco de consangüinidade, diminuindo a variabilidade genética;
- aparecimento de casos atípicos de scrapie e outras EETs, cujos genótipos selecionados não sejam resistentes;
- interferência em outras características produtivas.

Apesar destas preocupações, uma recente avaliação de risco biológico (EFSA, 2006) considera que, baseado nos dados atuais disponíveis, não existem riscos gerais, em nenhum dos itens listados anteriormente, associados com o atual programa de cruzamentos proposto pela decisão 2003/100/EC da União Europeia (EU, 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a genotipagem do gene PrP, nos códons 136, 154 e 171, e a correlação do polimorfismo do gene com a presença da prion, determinante do scrapie em ovinos, seguiram-se várias etapas, apresentadas na figura 4.

FIGURA 4 – Fluxograma das etapas da genotipagem do gene PrP, para os códons 136, 154 e 171, de diferentes raças de ovinos do Estado do Paraná



3.1 SELEÇÃO DE REBANHOS

Foram avaliados ovinos de diferentes raças e propriedades no Estado do Paraná, sendo colhidas amostras de sangue de animais das principais raças de corte: Suffolk, Hampshire Down; Texel; Ile de France; Dorper; Dorset; Santa Inês. O recrutamento das propriedades e dos rebanhos foi feito por meio de contato com proprietários, criadores de animais de raça pura, e que, após explicação do trabalho a ser realizado, estivessem dispostos a ceder amostras de sangue de seus animais.

O critério de inclusão de animais foi definido baseado no grau de pureza racial. Para tanto, os animais deviam ser Puros de Origem (PO), devidamente registrados na Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (ARCO) para que pudessem ser incluídos como representantes da raça. Apenas amostras de animais da raça Crioula e dois exemplares da raça Damara não eram registrados.

Procurou-se selecionar o maior número de animais geneticamente não relacionados (sem parentesco), quando das colheitas de sangue. Muitas vezes, numa propriedade, era possível encontrar animais comprados de outros criadores, geralmente os reprodutores, e com genitores totalmente diferentes, o que permitiu que, dentro de uma mesma propriedade, existissem origens genéticas diferenciadas. Para comprovar estas origens genéticas diferentes, posteriormente às colheitas de sangue, foram analisadas as genealogias dos animais amostrados (por meio dos Registros Genealógicos, disponibilizados *online* pela ARCO (<http://www.arcoovinos.com.br/>)).

Parte dos animais genotipados neste trabalho (128 animais) pertencia ao rebanho do Setor de Ovinocultura da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). Este rebanho era composto por dois grupos de animais: 53 animais puros da raça Hampshire Down (HD) e 75 animais mestiços, com diferentes graus de sangue das raças Texel, Ile de France, Hampshire Down e mesmo animais sem raça definida (SRD) e, ainda, 5 animais mestiços das raças Crioula (2), Ideal, Corriedale e Karakul. Reprodutores puros da raça Hampshire eram utilizados nos cruzamentos das fêmeas mestiças. Do rebanho puro, exceto por quatro ovelhas mais velhas (nascimento entre 1997 e 1999) e o reprodutor, todos os demais animais eram nascidos na propriedade. Já dos 75 animais mestiços, 33 (44,0%) foram comprados

de outras propriedades, nos anos de 2002 e 2003, e o restante era nascido no Setor de Ovinocultura da PUCPR.

Este rebanho foi selecionado para o estudo por ter casos confirmados de scrapie, tornando estes animais potencialmente contaminados pelo prion. Foram registrados três casos no período de janeiro de 2003 a outubro de 2004 (POHL DE SOUZA *et al.* 2005).

3.2 GENOTIPAGEM

Para a genotipagem dos códons 136, 154 e 171 foram utilizadas duas técnicas: Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição – RFLP (do termo em inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*) e seqüenciamento direto em seqüenciador automático.

3.2.1 Extração e purificação do DNA

A extração do DNA foi feita a partir de amostras congeladas de sangue. O sangue era colhido da veia jugular externa, utilizando frascos a vácuo contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante. Após a colheita, os frascos eram mantidos sob refrigeração até chegarem ao laboratório, onde eram colocados em freezer a 20°C negativos até o início da extração.

A extração e purificação do DNA foram feitas utilizando proteinase K e fenol/clorofórmio, conforme SAMBROOK e RUSSELL (2001). Esta técnica é para a extração de DNA de alto peso molecular e está adaptada a amostras de sangue congeladas.

Para extração e purificação do DNA, inicialmente as amostras de sangue eram descongeladas em estufa a 37 °C. Em seguida era transferido 1 mL de sangue para tubos de 2 mL e adicionado volume/volume de solução salina fosfatada (PBS – 0,01M NaHPO₄ e 0,15M NaCl, pH 7,2). Centrifugava-se a 3500 xg durante 15 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante era retirado, permanecendo apenas o sedimento no fundo do tubo, ao qual era adicionado 1 mL de tampão de

lise (TE – 10mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1M EDTA pH 8,0 e 0,5% SDS). Agitava-se vigorosamente em vórtex.

Uma solução a 20 ng/mL de RNase era adicionada, atingindo uma concentração final de 40 µg/mL. As amostras, então, permaneciam em banho-maria a 37° C durante 1h. Após este tempo, adicionava-se proteinase K (solução a 20 ng/mL), numa concentração final de 100 µg/mL e permaneciam em banho-maria a 50 °C durante 3h.

Uma vez retiradas do banho-maria, as amostras eram mantidas à temperatura ambiente e adicionava-se volume/volume de fenol saturado pH 8,0, homogeneizando bem. Centrifugava-se a 5000 xg durante 15 minutos à temperatura ambiente. Eram transferidos 800 µl do sobrenadante para outro tubo e repetia-se o procedimento. Adicionava-se então volume/volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), repetindo a centrifugação e retirando-se 400 µl do sobrenadante. Por último, volume/volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), centrifugando-se e retirando 200 µl do sobrenadante. Para a precipitação do DNA acrescentava-se 0,1 volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,5, e homogeneizava-se. Adicionavam-se 2 volumes de etanol absoluto gelado e as amostras eram mantidas em freezer a 20 °C negativos durante a noite.

No dia seguinte, era feita uma centrifugação a 12000 xg durante 30 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante era desprezado e os sedimentos (que continham o *pellet* de DNA) eram lavados com álcool 70%, centrifugando a 12000 xg durante 5 minutos. Este processo era repetido e a seguir deixava-se secar à temperatura ambiente e fazia-se a ressuspensão em 100 µl de tampão tris-EDTA (TE – 10mM TrisHCl pH 8,0 e 1M EDTA pH 8,0).

A quantificação e avaliação da pureza das amostras de DNA obtidas foram realizadas por espectrofotometria, determinando a absorbância em 260 e 280nm, sendo sua integridade verificada em gel de agarose a 1%. A leitura em 260 nm fornece a concentração de ácidos nucleicos e a leitura em 280nm, de proteína. A divisão do resultado obtido em 260nm pelo obtido em 280nm serve como referência da qualidade da amostra, devendo estar entre 1,8 e 2,0.

3.2.2 PCR-RFLP

Uma das técnicas utilizadas para a genotipagem do gene PrP foi a análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição – RFLP (*“Restriction Fragment Length Polymorphism”*). Para distinguir os cinco alelos baseados no polimorfismo dos códons 136 (alanina, A/ valina, V); 154 (histidina, H/ arginina, R) e 171 (histidina, H/ glutanina, Q/ arginina; R), as amostras de DNA obtidas na extração foram submetidas a duas reações de PCR e, posteriormente, o produto de cada uma delas foi clivado pelas enzimas de restrição (ER) *BspDI* e *BspHI*, segundo LÜHKEN *et al.* (2004), com modificações.

Para a amplificação dos dois fragmentos de DNA, foi realizada uma reação de 30 µl (tabela 5). Após a preparação da mistura, era acrescentado o DNA do animal, homogeneizado e as misturas para a amplificação eram colocadas no termociclador Thermo Hybaid. Após uma desnaturação inicial a 94 °C durante 1,5 minutos, eram realizados 40 ciclos de amplificação, incluindo desnaturação a 94 °C por 20 segundos, hibridação a 55 °C por 20 segundos e extensão a 72 °C por 20 segundos, seguidos de uma extensão final durante 5 minutos a 72 °C.

TABELA 5 – Componentes e suas concentrações nas duas reações de PCR realizadas para a posterior clivagem por enzimas de restrição

	Volume na reação	Concentração	Concentração Final
Tampão	3,0 µl	10 x	1 x
Cloreto de magnésio	1,0 µl	50 mM	1,5 mM
deoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP)	0,6 µl	10 mM	0,2 mM
Iniciador direto	0,5 µl	20 pmol/µl	10 pmol
Iniciador reverso	0,5 µl	20 pmol/µl	10 pmol
Taq Polimerase	0,12 µl	5 U/µl	0,6 U
DNA	2,0 µl	variável	variável
Água ultra pura	22,28 µl		

Em ambas as reações de PCR, os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) diretos eram iguais, variando os iniciadores reversos (quadro 3). O conjunto de iniciadores 1 e 3 foi utilizado na primeira reação de PCR e o conjunto 2 e 4, na segunda. A região amplificada corresponde à do nucleotídeo 342 até a do nucleotídeo 539 (iniciadores 1 e 3) e 538 (iniciadores 2 e 4) do PRNP, gerando produtos de, respectivamente, 197 e 196 pares de bases (pb).

QUADRO 3 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas duas reações de PCR-RFPL para amplificação do gene PrP

Primer	Seqüência
Iniciador 1 – DIRETO	5'- TGTGGCAGGAGCTGCTGCAGCT – 3'
Iniciador 3 – REVERSO	5'- TGCACAAAGTTGTTCTGGTTACTATC – 3'
Iniciador 2 – DIRETO	5'- TGTGGCAGGAGCTGCTGCAGCT – 3'
Iniciador 4 – REVERSO	5'- GCACAAAGTTGTTCTGGTTACTATAT – 3'

Terminada a reação de amplificação, os produtos da PCR eram analisados em gel de agarose a 1,6%, preparado em tampão TAE 1X (0,04 M Tris acetato e 1 mM de EDTA), a fim de identificar as amostras com produtos únicos da amplificação. A eletroforese era realizada em sistema de gel submerso em tampão TAE 1X, a 60V. Para aplicação no gel, 10 µl do produto de PCR eram misturados a 1 µl de tampão para aplicação de amostras de DNA em gel 10X (0,025% de azul de bromofenol e 50% de glicerol), marcador de migração das amostras de DNA. Também eram aplicadas, em cada gel, amostras de padrão de massa molecular. O gel posteriormente era corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), por 20 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado. O tamanho dos produtos de PCR foi estimado pela interpolação em escala semi-logarítmica da distância de migração do padrão de massa molecular. As amostras eram, então, mantidas congeladas a 20 °C negativos até a clivagem com as enzimas de restrição.

Para as reações de clivagem, foram utilizadas as ER *BspDI* e *BspHI*. O produto da primeira PCR (iniciadores 1 e 3) era clivado somente com a ER *BspHI*. Já o produto da segunda PCR (iniciadores 2 e 4) era submetido à digestão com as

duas enzimas. A reação de clivagem (tabela 6) depois de preparada era mantida em estufa a 37 °C, durante toda a noite (média de 12 horas). As amostras eram submetidas à eletroforese em gel de agarose numa concentração de 2,5%, preparado em tampão TBE 1X (500 mM. de Tris-HCl, 60 mM de ácido bórico e 83 mM de EDTA). A corrida eletroforética era feita a 35V, durante 6 horas. Para aplicação no gel, o volume total da reação de clivagem, 15 µl, era misturado a 1,5 µl de tampão para aplicação de amostras de DNA em gel 10X (0,025% de azul de bromofenol e 50% de glicerol). Também eram aplicadas amostras de padrão de massa molecular. O gel posteriormente era corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), por 20 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado para a análise dos genótipos, com auxílio do programa GELPROanalyzer.

TABELA 6 – Componentes e suas concentrações nas reações de clivagem dos produtos das duas PCR pelas ER *BspDI* e *BspHI*

	Primeira PCR (primers 1 e 3)		Segunda PCR (primers 2 e 4)	
	volume na reação	concentração final	volume na reação	concentração final
Tampão 10x	1,5 µl	1x	1,5 µl	1x
<i>BspHI</i> (10 U/µl)	0,25 µl	2,5 U	0,25 µl	2,5 U
<i>BspDI</i> (5 U/µl)	-	-	0,5 µl	2,5 U
Produto da PCR	8,0 µl	variável	8,0 µl	variável
Água ultra pura	5,25 µl		4,75 µl	

O produto de 197 pb da primeira PCR foi produzido pelo iniciador reverso modificado 3 (quadro 3), que cria um sítio de restrição artificial para a ER *BspHI* quando há histidina na posição 171 (figura 5). A enzima *BspHI* tem o seguinte sítio de restrição (mesmo sítio de restrição das enzimas *PagI*, *RcaI*):

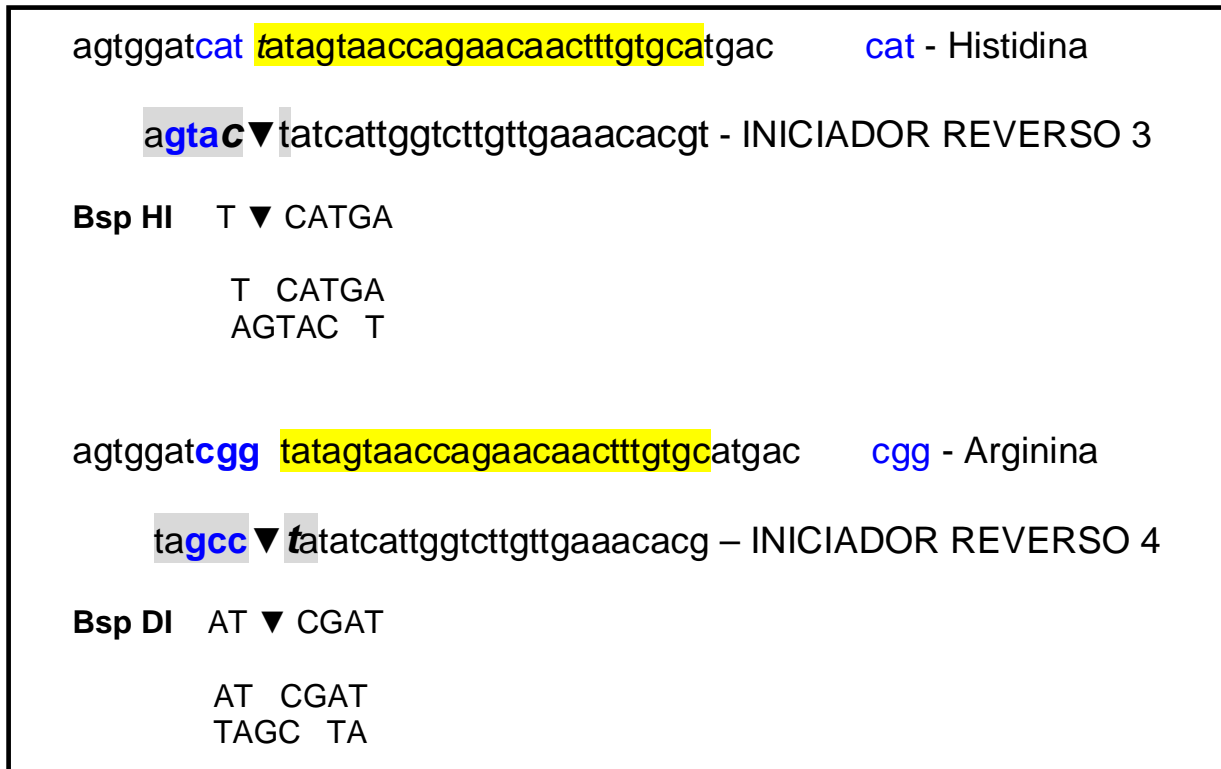
T ▼ CATGA
T CATGA
AGTAC T

O produto de 196 pb da segunda PCR, produzido pelo iniciador reverso modificado 4 (quadro 3), possui um sítio de restrição artificial para a ER *BspDI* quando há arginina na posição 171 (figura 5). A enzima *BspDI* tem o seguinte sítio de restrição (mesmo sítio de restrição das enzimas *BamIII*, *Bsa29I*, *Bscl*, *BseCI*, *BsiXI*, *Bsp106I*, *BspXI*, *Bsu15I*, *ClaI*):

AT ▼ CGAT
AT CGAT
TAGC TA

Em ambos os fragmentos, os códons para a valina na posição 136 e para histidina na posição 154 são sítios de restrição para a enzima *BspHI*.

FIGURA 5 – Sítios artificiais de restrição, criados pelos iniciadores reversos 3 e 4, nos produtos de amplificação da primeira e segunda PCR e clivados por enzimas de restrição



Incluindo todas as possibilidades para cada alelo em cada uma das PCR-RFLP, é possível montar uma tabela com todos os tamanhos de fragmentos esperados para os 15 diferentes genótipos do PrP normalmente encontrados em ovinos (tabela 7).

TABELA 7 – Tamanhos dos produtos de PCR com 197 e 196 pb, após a digestão com as enzimas *Bsp*HI e *Bsp*DI dos 5 alelos e 15 genótipos do gene PrP comumente encontrados em ovinos

ALELOS		
	197 pb – <i>Bsp</i> HI	196 pb – <i>Bsp</i> HI e <i>Bsp</i> DI
ARR	197	170 (26)
ARQ	197	196
ARH	172 (25)	196
AHQ	118 e 79	118 e 78
VRQ	131 e 66	130 e 66
GENÓTIPOS		
	197 pb – <i>Bsp</i> HI	196 pb – <i>Bsp</i> HI e <i>Bsp</i> DI
ARR/ARR	197	170 (26)
ARR/ARQ	197	196 e 170 (26)
ARR/ARH	197 e 172 (25)	196 e 170 (26)
ARQ/ARQ	197	196
ARQ/ARH	197 e 172 (25)	196
ARH/ARH	172 (25)	196
AHQ/AHQ	118 e 79	118 e 78
VRQ/VRQ	131 e 66	130 e 66
ARR/AHQ	197, 118 e 79	170 (26), 118 e 78
ARR/VRQ	197, 131 e 66	170 (26), 130 e 66
ARQ/AHQ	197, 118 e 79	196, 118 e 78
ARQ/VRQ	197, 131 e 66	196, 130 e 66
ARH/AHQ	172 (25), 118 e 79	196, 118 e 78
ARH/VRQ	172 (25), 131 e 66	196, 130 e 66
AHQ/VRQ	131, 118, 79 e 66	130, 118, 78 e 66

3.2.3 Seqüenciamento

A outra técnica utilizada para a genotipagem do gene PrP foi o seqüenciamento. A reação de seqüenciamento foi realizada a partir de produto de PCR, utilizando o *Dyenamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Amersham Biosciences). Após a reação, os produtos fluorescentes eram analisados em seqüenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems) conforme protocolo e programas recomendados pelo fabricante.

Inicialmente, uma primeira PCR era realizada, amplificando o gene PrP na sua totalidade. O iniciador direto 5'-ATGGTGAAAAGCCACATAGGCAGT-3' e o iniciador reverso 5'-CTATCCTACTATGAGAAAAATGAG-3' correspondem ao início e ao final do gene PrP. Para esta amplificação, uma mistura de 50 µl era preparada (tabela 8), as amostras eram acrescentadas, homogeneizadas e as misturas para amplificação colocadas no termociclador MJ Research (PTC-100).

TABELA 8 – Componentes e suas concentrações na reação de PCR realizada para o posterior seqüenciamento

	Volume na reação	Concentração	Concentração Final
Tampão	5,0 µl	10 x	1 x
Cloreto de magnésio	1,5 µl	50 mM	1,5 mM
dNTP	2,0 µl	5 mM	0,2 mM
Iniciador direto	0,5 µl	20 pmol/µl	10 pmol
Iniciador reverso	0,5 µl	20 pmol/µl	10 pmol
Taq Polimerase	0,2 µl	5 U/µl	1,0 U
DNA	3,0 µl	variável	variável
Água ultra pura	37,3 µl		

Após uma desnaturação inicial a 95 °C durante 5 minutos, 40 ciclos de amplificação eram realizados, incluindo desnaturação a 95 °C por 1 minuto,

hibridação a 60 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1,5 minutos, seguidos de uma extensão final durante 7 minutos a 72 °C.

Terminada a reação de amplificação, era realizada a eletroforese em gel de agarose a 1,6%, preparado em tampão TAE 1X (0,04 M Tris acetato e 1 mM de EDTA), a fim de identificar as amostras com produtos únicos de 771 pb. Estas amostras eram, então, mantidas congeladas a 20°C negativos para a posterior purificação e seqüenciamento.

A purificação dos produtos de PCR para posterior seqüenciamento direto foi realizada com a adição das enzimas SAP (*shrimp alkaline phosphatase*) e Exo I (Exonuclease I de *E.coli*). A limpeza dos produtos de PCR antes da reação de seqüenciamento faz-se necessária para a remoção dos iniciadores e inativação dos dNTPs não incorporados nos produtos de PCR. Os iniciadores são degradados pela ação da Exo I e os dNTPs podem ser desfosforilados pela ação da SAP.

Inicialmente era preparada uma solução SAP/Exo I, com concentração final de 0,2 U de cada enzima. Adicionava-se 5 µl desta solução SAP/Exo I em 5 µl do produto de PCR. No termociclador, eram incubadas a 37°C por 45 minutos, seguido de 80 °C por 15 minutos (para inativar as enzimas). Posteriormente, as amostras eram estocadas a 4°C.

Uma vez purificados os produtos da PCR, seguia-se para a reação de seqüenciamento propriamente dita. Nesta reação eram utilizados outros iniciadores, sendo o direto 5' - GTAAGCCAAAAACCAACATGAAGC - 3' e o reverso 5' - TCGCTCCATTATCTTGATGTCAGTTT - 3'. Para esta reação, os iniciadores estavam na concentração de 5 pmol/µl. Para a reação de seqüenciamento foi utilizado 5 µl do produto de amplificação purificado; 3 µl de reativo *Dynamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (composto por enzima, dNTPs, ddNTPs marcados com fluorescência e tampões), 1 pmol de iniciador direto ou reverso e água pura até um volume de 5 µl.

As amostras eram, então, colocadas no termociclador, com o seguinte programa:

1x	95° C	30 segundos
30x	60° C	2,5 minutos
1x	60° C	5 minutos

Os produtos da reação de seqüenciamento foram purificados adicionando-se 5 µl de água pura autoclavada; 1 µl de acetato de amônio 7,5 M e 30 µl etanol 95%. Os tubos foram centrifugados por 15 min a 13.000 xg, descartado o sobrenadante e o produto lavado com etanol 70% duas vezes. Após a última centrifugação, o sobrenadante era retirado e as amostras eram deixadas em local escuro por 30 minutos, à temperatura ambiente, para a evaporação do etanol. As amostras foram mantidas a 20°C negativos até análise no seqüenciador automático ABI 377.

A análise no seqüenciador automático ABI 377 gerou arquivos contendo o eletroforetograma de cada seqüência, que foram analisados pelo *software SeqManII (Lasergene - DNASTar)*.

3.3 DIAGNÓSTICO DA PrP^{Sc} POR IMUNOHISTOQUÍMICA

Em abril de 2006, de 128 animais do rebanho original da PUCPR, havia 118, pois 10 ovinos haviam morrido de causas diversas. Estes 118 animais foram abatidos e seus órgãos coletados para posterior análise, por imunohistoquímica (IHQ), da presença ou não do prion. O abate foi realizado no Frigorífico Argus, São José dos Pinhais. Os órgãos coletados foram: encéfalo; terceira pálpebra, tonsilas, íleo e baço.

Os fragmentos foram conservados em formol 10% e, em colaboração com o Laboratório de Referência em Diagnósticos de Doenças Priônicas, Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, foram analisados por imunohistoquímica, segundo técnica definida pelo MAPA (BRASIL, 2004).

Para a fixação do material utilizou-se formalina a 10%. Após o tempo necessário à fixação (cérebro e linfonodos inteiros - três a cinco dias de fixação; biópsia de linfonodos - dois dias; fragmentos de tecidos que tenham espessura em torno de sete milímetros - um dia), os tecidos eram clivados em fragmentos de aproximadamente dois milímetros de espessura e colocados em cassetes para inclusão em parafina. Para a descontaminação, eram embebidos em ácido fórmico a 95-98% durante 60 minutos. Após serem lavadas em água destilada, as lâminas eram colocadas novamente em formalina a 10% tamponada, durante 24 horas, para re-equilibrarem.

O tratamento com ácido fórmico elimina a infectividade do prion, presumivelmente por romper a estrutura em β folhas da forma protéica associada à doença. O ácido fórmico também aumenta a sensibilidade da imunocoloração e reduz a taxa de falsos positivos devido à detecção de PrP^C, normal da célula. Entretanto, o tratamento somente com ácido fórmico do antígeno não é adequado para a total eliminação do PrP celular endógeno dos tecidos linfóides.

Para o processamento e inclusão dos tecidos em parafina, seguia-se o processo de desidratação dos tecidos, através da imersão em seqüência das amostras em álcool 95%, por uma hora (3 vezes); álcool absoluto por uma hora (2 vezes) e xilol por uma hora (3 vezes).

Após este processamento, era feita a inclusão do material em parafina a uma temperatura variando de 58° C a 65 °C. As amostras a ser em testadas e os controles da prova nos blocos de parafina eram cortados em quatro a seis micrômetros de espessura e colocados em lâminas especiais (tipo Probe On Plus), seguindo as orientações de uso do fabricante. Foram utilizados controle positivo e controle negativo. Para remoção da parafina, as lâminas eram colocadas a 65°C por vinte minutos.

A reidratação dos tecidos era feita com lavagens subseqüentes em: xilol por cinco minutos; álcool absoluto por dois minutos; álcool 95% por dois minutos; álcool 80% por dois minutos; álcool 70% por um minuto.

O bloqueio da peroxidase endógena era realizado enxaguando as lâminas com uma solução de água oxigenada e metanol a 3%, sempre preparada antes do uso. Incubava-se por 10 minutos entre 22 °C e 25 °C com a mesma solução e, logo após, as lâminas eram enxaguadas submergindo-as quatro vezes em água bidestilada.

A ativação do antígeno era feita incubando-se os tecidos em uma solução de ácido fórmico a 95% por cinco minutos entre 22 °C e 25 °C, em um recipiente resistente ao ácido. Lavava-se cuidadosamente e neutralizava-se em tampão Tris-HCl, usando três enxágües rápidos, seguido de incubação por um minuto em tampão fresco. O pH do lavado final devia ficar entre 7 e 8.

Após, o suporte com as lâminas era transferido para um recipiente resistente ao calor, contendo solução tampão, envolvido em papel alumínio e era autoclavado

a 121 °C por vinte minutos. Em seguida, as lâminas eram transferidas para o tampão tris com Tween 20 (TBST) por dez minutos.

Para a coloração imunohistoquímica, proteinase K (concentração final de 250 µg/mL) era colocada sobre o corte do tecido na lâmina e incubada por 1,5 minutos. Enxaguava-se três vezes por vinte segundos, em TBST. Em seguida, era adicionado o anticorpo monoclonal F89/160.1.5 (O'ROURKE *et al.*, 1998b), diluído conforme recomendações do fabricante, e incubado por dez minutos. Enxaguava-se com TBST, três vezes por vinte segundos. Colocava-se 100 µl do complexo biotina-IgG anti-camundongo e incubava-se por dez minutos, entre 22 °C e 25 °C. Repetia-se o enxágüe. Colocava-se 100 µl da peroxidase-estreptavidina e incubava-se por dez minutos entre 22 °C e 25 °C. Novo enxágüe. Então era adicionado o substrato cromógeno diaminobenzidina (DAB) e incubava-se por quatro a cinco minutos. Enxaguava-se com água destilada, duas vezes por vinte segundos. Contracorava-se com hematoxilina por 30 segundos para tecidos linfóides e 10 minutos para encéfalo. Novo enxágüe com água e deixava-se em banho com solução de hidróxido de amônio 37 mM. Lavava-se novamente em água.

As lâminas eram deixadas na água até começar a montagem com lamínula. Para a desidratação dos tecidos eram realizadas as seguintes lavagens: álcool 70% por dois minutos; álcool 80% por dois minutos; álcool 95% por dois minutos; álcool absoluto por dois minutos; xilol por cinco minutos (2 vezes).

Montavam-se as lâminas utilizando bálsamo do Canadá natural ou sintético para fixar a lamínula e a leitura era feita em microscópio óptico.

3.4 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENÓTIPICAS

Para o cálculo das frequências alélicas e genótípicas foram utilizados os dados das análises de RFLP e de seqüenciamento. As frequências genotípica (f_{ij}) e alélica (p_i) foram calculadas pela contagem direta dos genótipos, conforme as fórmulas:

$$f_{ij} = \frac{n_{ij}}{N} \quad \text{e} \quad p_i = \frac{2 f_{ij} + \sum f_{ij}}{2}$$

Onde n_{ij} é o número de animais com genótipo ij e N é o número total de animais.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

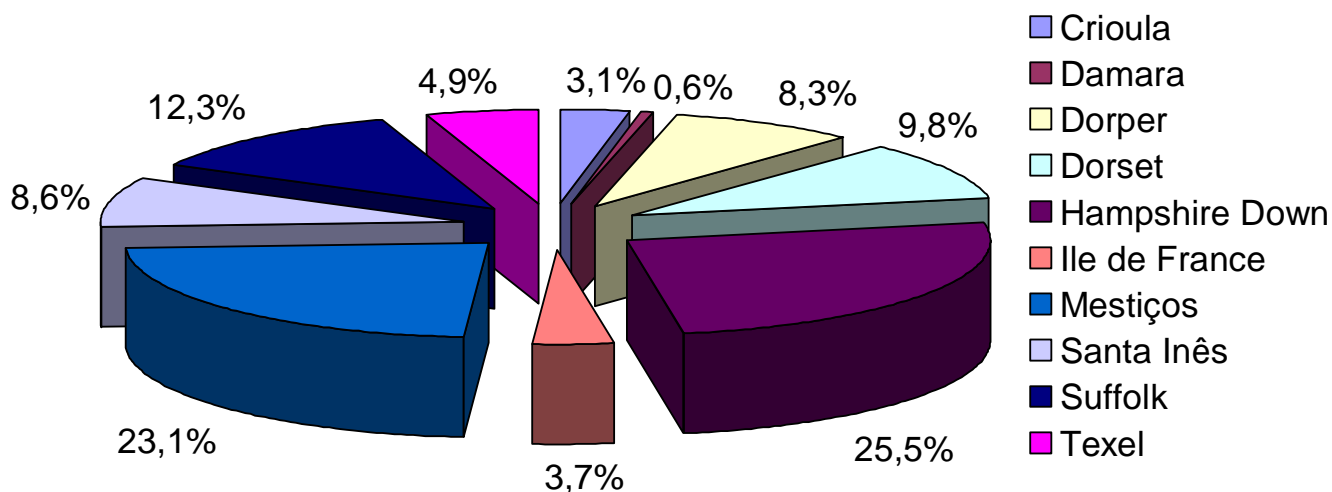
A análise estatística da associação entre os diferentes genótipos e a presença ou não do prion foi realizada montando-se tabelas de contingência e utilizando-se o método de qui-quadrado (χ^2) e teste exato de Fisher.

4 RESULTADOS

4.1 ANIMAIS

No total, foram colhidas amostras de sangue de 325 animais das raças Suffolk, Hampshire Down, Texel, Ile de France, Dorper, Dorset, Santa Inês, Crioula, Damara e animais mestiços, resultantes do cruzamento de diferentes raças. A raça Hampshire Down e os animais mestiços representam as maiores participações com 25,5% e 23,1%, respectivamente. A raça Suffolk, com 12,3%, aparece como a terceira raça mais freqüente (figura 6 e tabela 9).

FIGURA 6 – Porcentagem de participação de cada uma das raças ovinas, nas 325 amostras de sangue colhidas para genotipagem para resistência ao scrapie



As amostras foram obtidas em 22 propriedades, distribuídas em diferentes regiões do Estado do Paraná e representam 57 origens diferentes, ou seja, animais geneticamente não relacionados, oriundos de diferentes rebanhos, alguns inclusive de rebanhos de outros estados brasileiros (tabela 9).

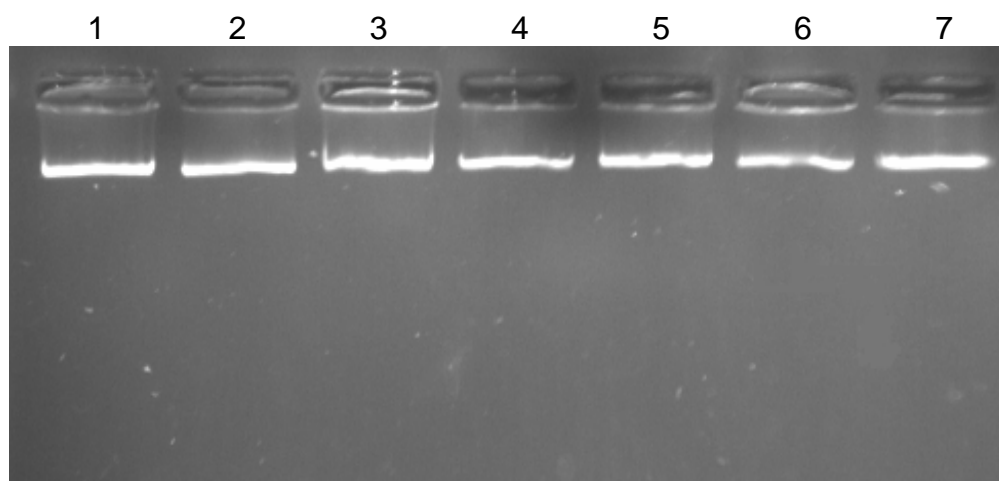
TABELA 9 – Número de animais e de rebanhos diferentes, segundo a raça

Raça	Animais n	Animais %	Nº rebanhos diferentes
Crioula	10	3,1	1
Damara	2	0,6	1
Dorper	27	8,3	7
Dorset	32	9,8	1
Hampshire Down	83	25,5	8
Ile de France	12	3,7	11
Mestiços	75	23,1	2
Santa Inês	28	8,6	7
Suffolk	40	12,3	10
Texel	16	4,9	9
TOTAL	325	100,0	57

4.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA

As extrações de DNA das 325 amostras resultaram em concentrações bastante variáveis, desde 6,2 µg/mL até 87,3 µg/mL. Já o grau de pureza destas amostras ficou entre 1,7 e 1,9. A integridade, qualidade e quantidade do DNA, avaliadas em gel de agarose a 1%, foram consideradas adequadas para os testes realizados (figura 7).

FIGURA 7 – Avaliação da integridade, qualidade e quantidade de DNA

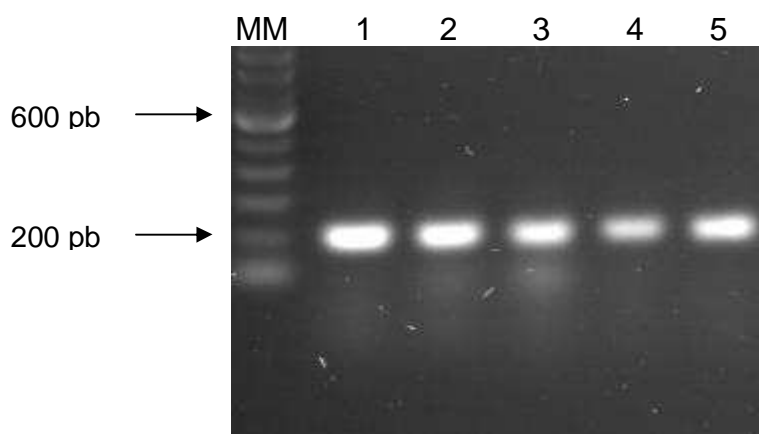


Legenda: 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7: amostras de DNA extraído de sangue de ovinos, avaliadas em gel de agarose a 1% e coradas com brometo de etídeo.

4.3 PCR e RFLP

A genotipagem do gene PrP foi realizada em 307 amostras pela análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição – RFLP. De cada amostra eram realizadas duas reações de PCR. O produto de amplificação da primeira PCR tinha 197 pb e a segunda gerava um fragmento de 196 pb (figura 8).

FIGURA 8 – Avaliação de banda única dos produtos de PCR de 197/196 pb

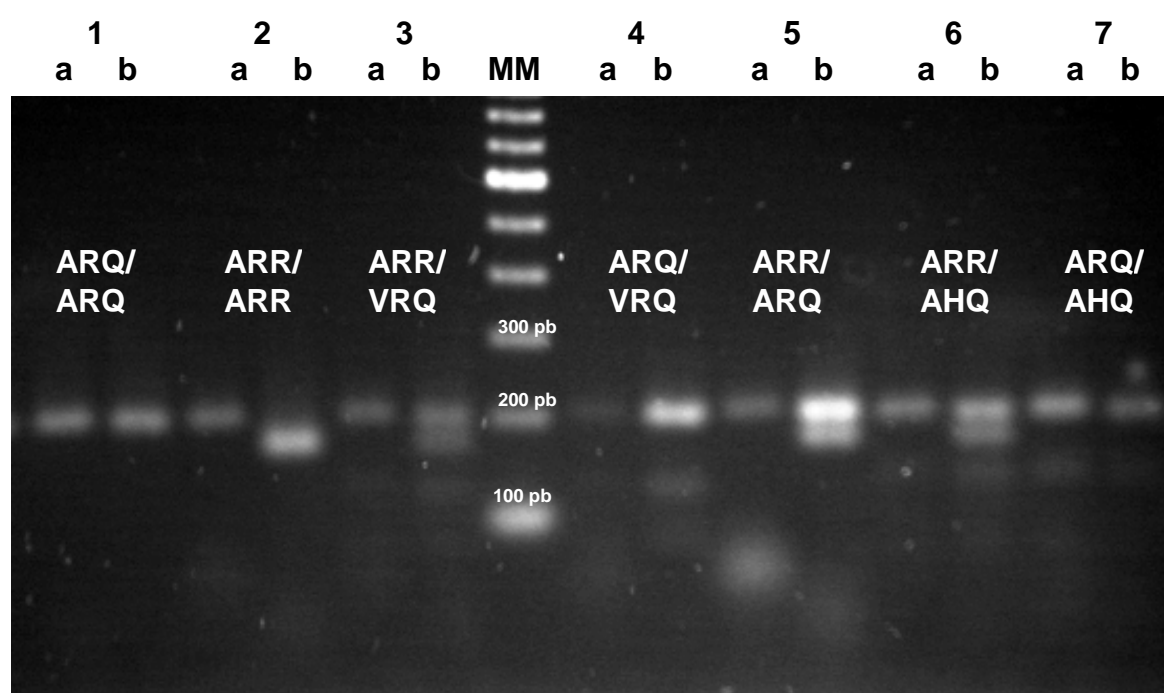


Legenda: MM – marcador de massa molecular (100 pb DNA Ladder – Invitrogen). 1, 2, 3, 4 e 5: produtos de amplificação de 196/197 pb, avaliados em gel de agarose a 1,6% e corados com brometo de etídeo.

A digestão do produto de PCR de 197pb com a enzima *Bsp*HI e a dupla digestão do produto de 196pb com as enzimas *Bsp*HI e *Bsp*DI resultam em dois padrões, que juntos definem os genótipos do gene PrP pela análise dos seus alelos (tabela 7). Ao total, foram submetidas às digestões 307 amostras cujos produtos haviam sido obtidos anteriormente nas duas PCR. Destas, 10 amostras também foram genotipadas pelo método do seqüenciamento e, em todos os casos, o resultado foi o mesmo.

Nas amostras analisadas, foram observados 4 dos 5 alelos do gene PrP comumente encontrados em ovinos: ARR; ARQ; VRQ; AHQ. Em nenhum caso foi observado o alelo ARH. Estes 4 alelos formaram sete genótipos diferentes, dos 15 possíveis: ARR/ARR; ARR/ARQ; ARQ/ARQ; ARR/VRQ; ARR/AHQ; ARQ/VRQ e ARQ/AHQ (figura 9).

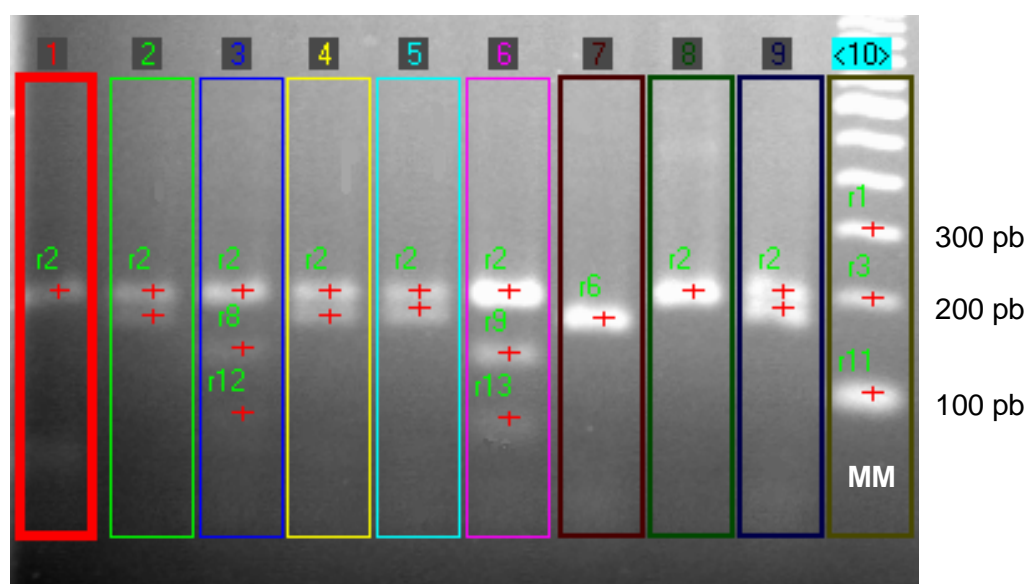
FIGURA 9 – Análise dos sete genótipos do gene PrP identificados pela técnica de PCR-RFLP



Legenda: MM – marcador de massa molecular (100 pb DNA Ladder – Invitrogen).
 1 a 7: os sete genótipos encontrados e identificados pela análise das duas reações (a e b) de clivagem por enzimas de restrição, em eletroforese em gel de agarose a 2,5%, corado com brometo de etídeo.
 a) Fragmento de PCR de 197 pb digerido pela enzima *Bsp*HI;
 b) Fragmento de PCR de 196 pb digerido pelas enzimas *Bsp*HI e *Bsp*DI.

A separação dos genótipos ARR/VRQ, ARQ/ARQ, ARR/AHQ e ARQ/AHQ, que apresentavam três fragmentos após a digestão (ver Tabela 7, material e métodos), foi possível graças à utilização do programa GELPROanalyzer para a correta identificação do tamanho das bandas. Na figura 10, estão ilustradas as respectivas bandas e a utilização deste programa em nove amostras.

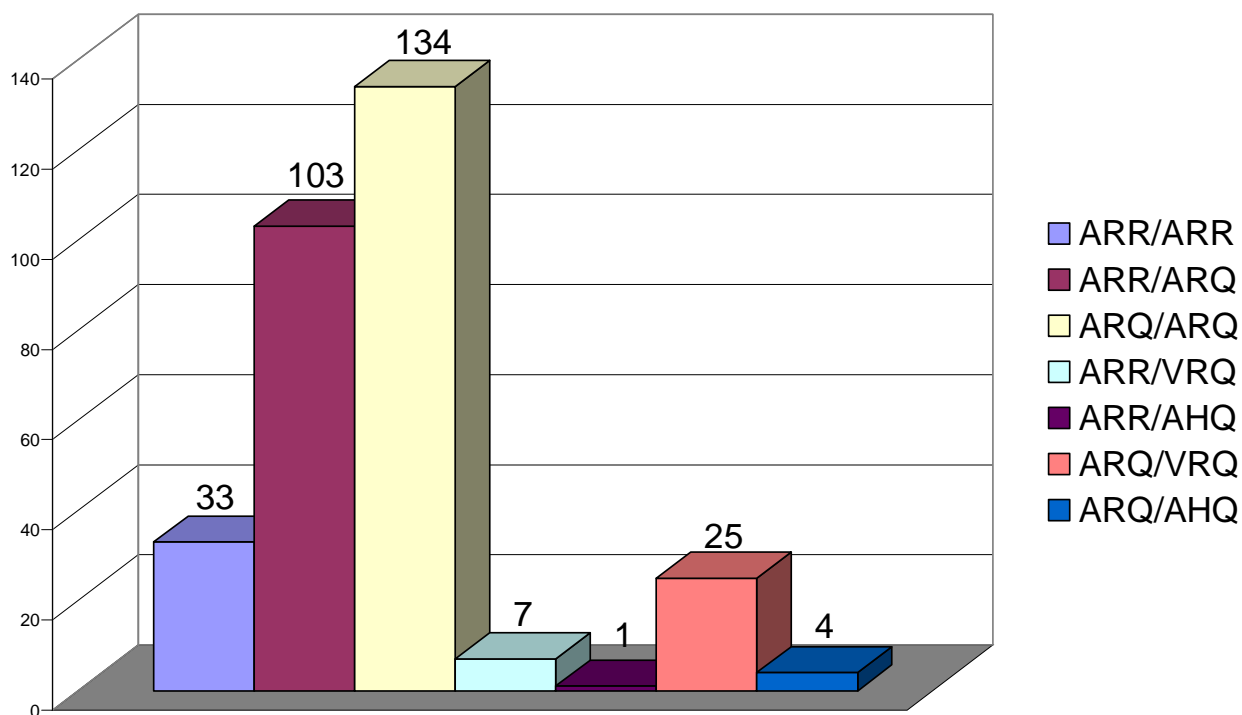
FIGURA 10 – Produtos da RFLP em gel de agarose a 2,5%, corados com brometo de etídeo e analisados pelo programa GELPRO analyzer



Legenda: 10 – MM – marcador de massa molecular (100 pb DNA Ladder – Invitrogen).
1 a 9: amostras de produtos da RFLP de diferentes genótipos e com as bandas identificadas pela cruz em cor vermelha, indicando a localização de cada banda para posterior comparação com o marcador de massa molecular. Bandas com a mesma denominação (r2, por exemplo) indicam o mesmo número de pb.

O genótipo ARQ/ARQ foi o mais freqüente, presente em 134 amostras (43,6%), seguido pelo genótipo ARR/ARQ, em 103 amostras (33,6%); ARR/ARR em 33 amostras (10,7%); ARQ/VRQ em 25 amostras (8,1%) e ARR/VRQ, em 7 amostras (2,3%). Os genótipos com os alelos AHQ apresentaram os menores percentuais, com apenas quatro amostras (1,3%) do genótipo ARQ/AHQ e uma única amostra de ARR/AHQ (0,3%). A figura 11 ilustra a distribuição dos diferentes genótipos, nas 307 amostras analisadas pelo método de PCR-RFLP.

FIGURA 11 – Distribuição dos sete genótipos do gene PrP, encontrados nas 307 amostras de ovinos procedentes do Estado do Paraná, Brasil, analisadas segundo a técnica de PCR-RFLP

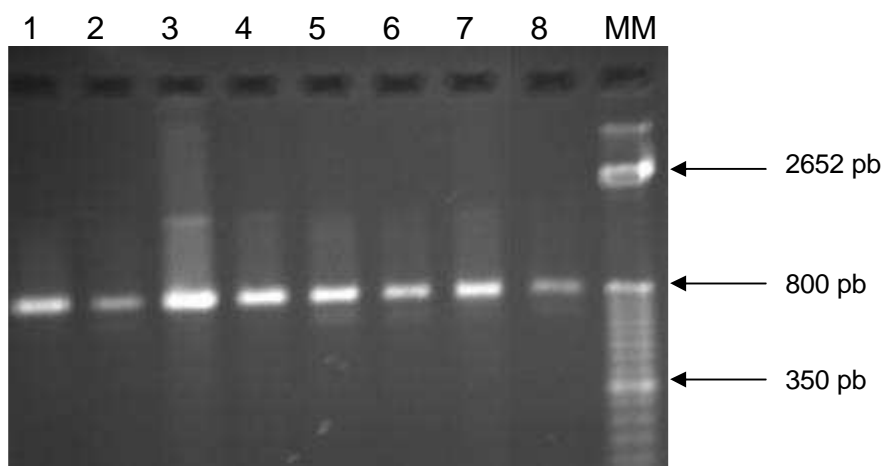


4.4 SEQÜENCIAMENTO

Para o seqüenciamento, inicialmente era realizada uma amplificação do gene PrP. O produto desta PCR era um fragmento de 771 pb (figura 12).

Foram realizadas 30 reações de seqüenciamento com os produtos da amplificação purificados. Em 93,33% delas, foi possível definir o genótipo da amostras. Nas demais, devido à qualidade insuficiente para atribuição de base nas regiões alvo, não foi possível a genotipagem.

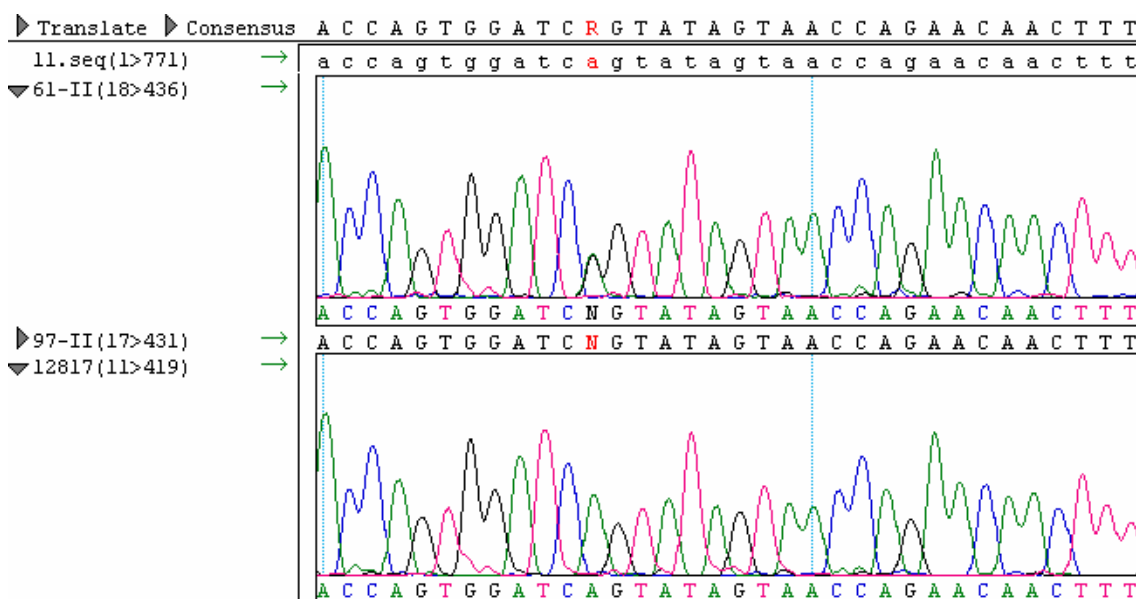
FIGURA 12 – Avaliação de banda única de produtos de PCR de 771 pb



Legenda: MM – marcador de massa molecular (50 pb DNA Ladder – Invitrogen).
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8: produtos de amplificação de 771 pb, avaliados em gel de agarose a 1,6% e corados com brometo de etídeo.

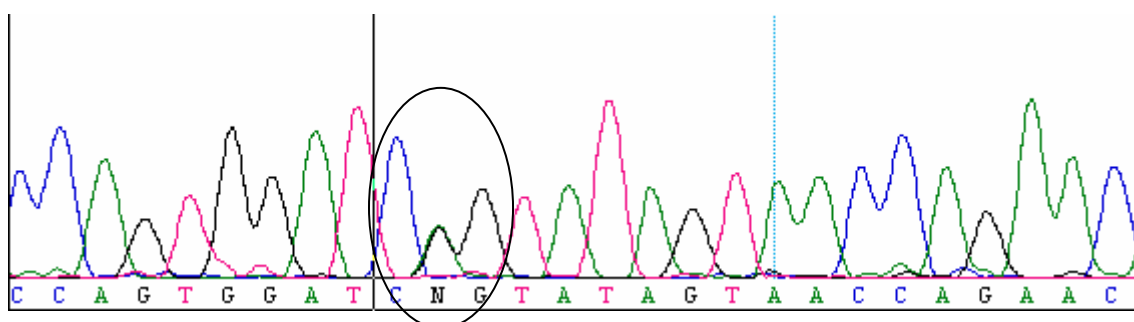
Em média, era possível seqüenciar 379,6 nucleotídeos em cada produto de amplificação. A figura 13 mostra o eletroferograma gerado pelo programa *SeqMan* (*Lasergene – DNASTar*) de duas das amostras em que foi possível seqüenciar 436 e 419 pb.

FIGURA 13 – Eletroferograma de duas amostras seqüenciadas, na região entre os nucleotídeos 500 e 534



Nas amostras com alelos diferentes foi possível, por meio da análise do eletroferograma, identificar a heterozigose na região de interesse (figura 14).

FIGURA 14 – Eletroferograma da amostra 397, na região do códon 171, mostrando uma amostra heterozigota para os nucleotídeos guanina (CGG - Arginina) e adenina (CAG – Glutamina), resultando no genótipo RQ



Somente amostras das raças Hampshire Down (14 amostras), Texel (1 amostra) e Mestiços (13 amostras) foram seqüenciadas. Os alelos ARR e ARQ foram encontrados em todas as amostras, sendo que o genótipo mais freqüente foi o ARR/ARQ, presente em 39,29% das amostras. Os genótipos ARQ/ARQ e ARR/ARR corresponderam a 32,14% e 17,86% dos animais genotipados pelo seqüenciamento, respectivamente. Já o genótipo ARQ/VRQ estava presente em 10,71% (tabela 10). Os alelos AHQ e ARH não foram encontrados em nenhuma amostra.

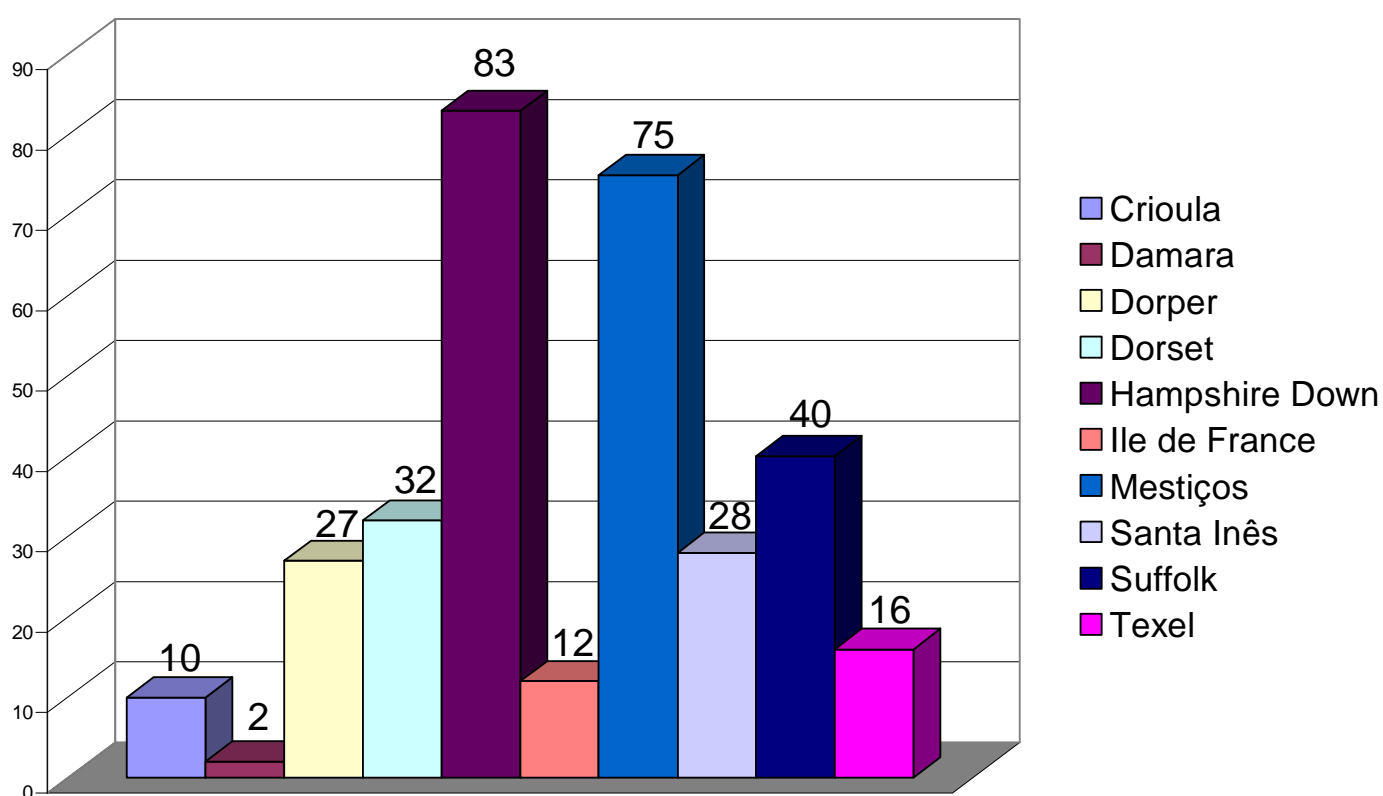
TABELA 10 – Distribuição (n) dos 4 genótipos, segundo a raça, das 28 amostras genotipadas pelo método do seqüenciamento

	ARR/ ARR	ARQ/ ARQ	ARR/ ARQ	ARQ/ VRQ
Hampshire Down	0	7	5	2
Texel	1	0	0	0
Mestiços	4	2	6	1
TOTAL	5	9	11	3

4.5 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS

Somando-se os dados de análise dos genótipos por meio do seqüenciamento e RFLP, totalizam-se 325 amostras genotipadas, representando as principais raças de ovinos de corte criados no Paraná. A porcentagem de representação de cada uma das raças no total de amostras genotipadas para o prion PrP está representada na figura 15.

FIGURA 15 – Número de animais de cada uma das raças ovinas, nas 325 amostras genotipadas do gene PrP, pelas técnicas de PCR-RFLP e seqüenciamento



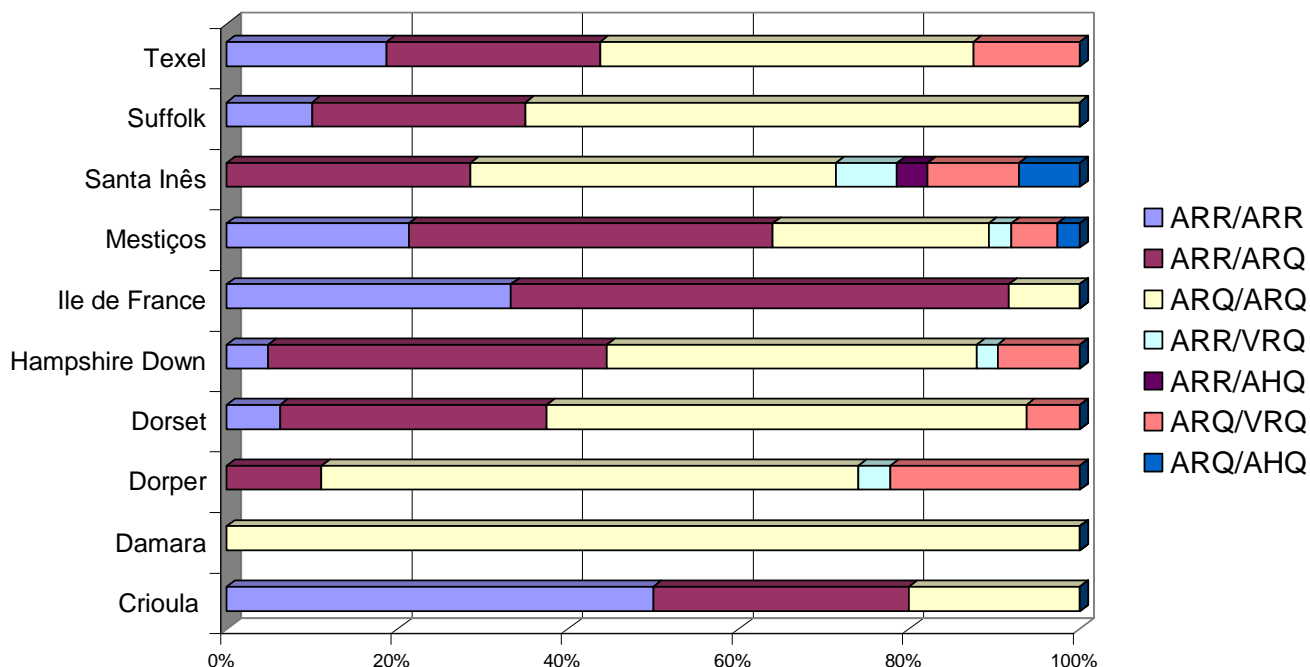
A genotipagem pela técnica de PCR-RFLP e seqüenciamento dos animais pertencentes às nove raças estudadas e os animais mestiços mostra que os genótipos ARR/ARQ e ARQ/ARQ são os mais freqüentes (tabela 11).

TABELA 11 – Distribuição (n) dos sete genótipos, segundo a raça, dos 325 animais genotipados pelo método de PCR-RFLP e seqüenciamento

Raça	Nº animais	ARR/ARR	ARR/ARQ	ARQ/ARQ	ARR/VRQ	ARR/AHQ	ARQ/VRQ	ARQ/AHQ
Crioula	10	5	3	2	-	-	-	-
Damara	2	-	-	2	-	-	-	-
Dorper	27	-	3	17	1	-	6	-
Dorset	32	2	10	18	-	-	2	-
Hampshire Down	83	4	33	36	2	-	8	-
Ile de France	12	4	7	1	-	-	-	-
Mestiços	75	16	32	19	2	-	4	2
Santa Inês	28	-	8	12	2	1	3	2
Suffolk	40	4	10	26	-	-	-	-
Texel	16	3	4	7	-	-	2	-
TOTAL	325	38	110	140	7	1	25	4

Excetuando-se a raça Damara, em que foram genotipados apenas dois animais e ambos eram ARQ/ARQ, em todas as demais raças, foram encontrados os genótipos ARQ/ARQ e ARR/ARQ, variando apenas a freqüência. O genótipo ARR/ARR não foi observado nas raças Dorper e Santa Inês. Genótipos com a presença do alelo AHQ somente foram observados nos animais mestiços e na raça Santa Inês. Genótipos com o alelo VRQ, por sua vez, não foram observados nas raças Ile de France e Suffolk. Entre as raças analisadas, a que apresentou maior variabilidade, com seis genótipos diferentes, foi a raça Santa Inês, assim como os mestiços, que também apresentaram 6 genótipos (figura 16).

FIGURA 16 – Distribuição das freqüências genótípicas, segundo a raça, dos 325 animais genotipados pelo método de PCR-RFLP e seqüenciamento



As freqüências genótípicas calculadas para as 325 amostras genotipadas demonstraram que o genótipo com maior freqüência foi o ARQ/ARQ, com média de 0,47, variando de 0,20 na raça Crioula a 0,65 na Suffolk. O segundo genótipo mais freqüente foi o ARR/ARQ, com 0,29 de média e variando de 0,11 no Dorper a 0,58 na raça Ile de France; seguido pelo genótipo ARR/ARR com 0,14 de média e não sendo encontrado nas raças Dorper e Santa Inês. Já os genótipos ARQ/VRQ, ARR/VRQ; ARQ/AHQ e ARR/AHQ apresentaram uma freqüência genotípica média de apenas 0,07, 0,02, 0,01 e 0,004, respectivamente (tabela 12).

TABELA 12 – Frequências genotípicas, segundo a raça, dos animais genotipados pelo método de PCR-RFLP e seqüenciamento

Raça	Frequência genotípica						
	ARR/ ARR	ARR/ ARQ	ARQ/ ARQ	ARR/ VRQ	ARR/ AHQ	ARQ/ VRQ	ARQ/ AHQ
Crioula	0,50	0,30	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00
Damara	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Dorper	0,00	0,11	0,63	0,04	0,00	0,22	0,00
Dorset	0,06	0,31	0,56	0,00	0,00	0,06	0,00
Hampshire Down	0,05	0,40	0,43	0,02	0,00	0,10	0,00
Ile de France	0,33	0,58	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00
Santa Inês	0,00	0,29	0,43	0,07	0,04	0,11	0,07
Suffolk	0,10	0,25	0,65	0,00	0,00	0,00	0,00
Texel	0,19	0,25	0,44	0,00	0,00	0,13	0,00
Mestiços	0,21	0,43	0,25	0,03	0,00	0,05	0,03

Quando se faz o cálculo das frequências alélicas, constata-se que o alelo ARQ é o mais freqüente, com média de 0,65, seguido pelo alelo ARR, com frequência média de 0,30. Os alelos VRQ e AHQ apresentaram frequências alélicas médias, respectivamente, de 0,04 e 0,01. O alelo ARH não foi encontrado em nenhuma das amostras analisadas (tabela 13).

TABELA 13 – Freqüências alélicas, segundo a raça, dos animais genotipados pelo método de PCR-RFLP e seqüenciamento

Raça	Freqüência alélica				
	ARR	ARQ	VRQ	AHQ	ARH
Crioula	0,65	0,35	0,00	0,00	0,00
Damara	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
Dorper	0,07	0,80	0,13	0,00	0,00
Dorset	0,22	0,75	0,03	0,00	0,00
Hampshire Down	0,26	0,68	0,06	0,00	0,00
Ile de France	0,63	0,37	0,00	0,00	0,00
Santa Inês	0,20	0,66	0,09	0,05	0,00
Suffolk	0,23	0,77	0,00	0,00	0,00
Texel	0,31	0,63	0,06	0,00	0,00
Mestiços	0,44	0,51	0,04	0,01	0,00

Classificando os animais conforme os critérios da *National Scrapie Plan* (NSP) britânico (ver tabela 3 da Revisão Bibliográfica), observa-se que 14,4% e 29,5% do total de animais genotipados encontram-se nos tipos 1 e 2, respectivamente, e que não apresentam nenhuma restrição para a reprodução. No tipo 3, cujas restrições variam de acordo com o tipo de produção, observa-se que há 47,8% animais classificados. Nos tipos 4 e 5, que formam os grupos de animais que devem ser totalmente eliminados, quer por castração ou abate, encontram-se 1,6% e 6,7%, respectivamente, dos animais testados. A tabela 14 ilustra esta classificação de acordo com as diferentes raças.

TABELA 14 – Porcentagem de animais segundo classificação em tipo 1, 2, 3, 4, ou 5, de acordo com o NSP, para as diferentes raças

Raça	Nº animais	%				
		1	2	3	4	5
Crioula	10	50,0	30,0	20,0	0,0	0,0
Damara	2	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
Dorper	27	0,0	11,1	63,0	3,7	22,2
Dorset	32	6,2	31,3	56,2	0,0	6,3
Hampshire Down	83	4,8	39,8	43,4	2,4	9,6
Ile de France	12	33,3	58,3	8,4	0,0	0,0
Santa Inês	28	0,0	32,1	50,0	7,1	10,8
Suffolk	40	10,0	25,0	65,0	0,0	0,0
Texel	16	18,7	25,0	43,8	0,0	12,5
Mestiços	75	21,3	42,7	28,0	2,7	5,3
TOTAL/média	325	14,4	29,5	47,8	1,6	6,7

4.6 CASOS CLÍNICOS

Os 128 ovinos da propriedade da PUCPR eram oriundos de um rebanho potencialmente contaminados pelo prion, com casos confirmados anteriormente. Até o abate dos animais, em abril de 2006, haviam sido diagnosticados três casos de scrapie (POHL DE SOUZA *et al.*, 2005). Tratavam-se de três ovelhas puras da raça Hampshire Down, com idade variando entre 6 e 6,5 anos. Todas apresentaram como problema inicial prurido com intensidade variada (figura 17), sendo que um dos animais demonstrava alteração de comportamento, apresentando-se apático e outro, dificuldade de deambulação. Todas as ovelhas, quando estimuladas na região lombar, apresentavam um movimento característico de lábios e língua. Os três animais foram adquiridos do mesmo criatório, localizado no município de Teixeira Soares – Paraná e apresentavam um ascendente comum, que era pai de duas e avô materno de outra.

FIGURA 17 – Animal com histórico e diagnóstico laboratorial confirmado para scrapie. Queda de lã devido ao prurido



Durante o período de observação de 30 a 150 dias, em todos os casos foi constatado agravamento dos sinais, principalmente do prurido (que levou a formação de edemas localizados e áreas de alopecia, na região da garupa e flancos) e das alterações de comportamento (figura 18). Não foi observada emaciação importante em nenhum dos animais e apenas o último apresentou progressiva dificuldade em manter-se em estação. Na necropsia não foi observada nenhuma alteração macroscópica; o encéfalo foi retirado, fixado em formol a 20% e enviado pelo serviço oficial ao laboratório credenciado para o diagnóstico, que confirmou como positivos os três casos.

FIGURA 18 – Animal com histórico e diagnóstico laboratorial confirmado para scrapie. Áreas de alopecia e edema devido ao prurido



4.7 DIAGNÓSTICO DA PrP^{Sc} POR IMUNOHISTOQUÍMICA

O resultado das análises imunohistoquímicas (IHQ) dos 118 animais do rebanho infectado mostrou que 103 amostras (87,3%) eram negativas para o scrapie em todos os órgãos e tecidos pesquisados. Quinze animais (12,7%) eram positivos, apresentando reação para um ou mais tecidos. A figura 19 mostra a coloração da reação de IHQ em tonsila de um dos animais positivos.

Os 15 animais positivos apresentaram diferenças quanto aos órgãos e tecidos reativos. Nenhuma das amostras foi positiva para todos os tecidos e não houve reação positiva em nenhuma das amostras de íleo e baço. A tonsila foi o tecido que apresentou maior porcentagem de amostras reativas, 73,3%. Em dois animais, o tecido linfóide da terceira pálpebra foi reativo; em uma amostra, o resultado foi positivo para tonsila (figura 19) e óbex, em outra amostra somente para óbex (tabela 15).

FIGURA 19 – Coloração imunohistoquímica do anticorpo monoclonal F89/160.1.5 em tonsila de ovino

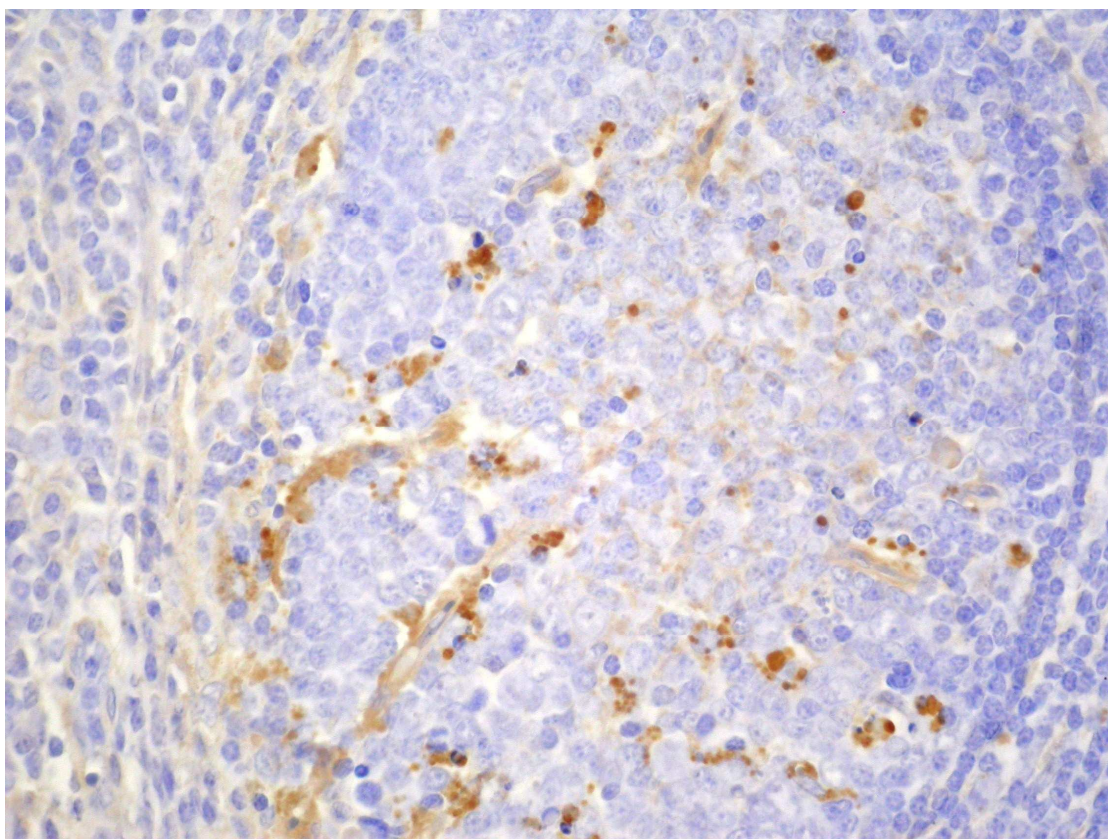


TABELA 15 – Órgãos positivos na IHQ das 15 amostras positivas para scrapie e a porcentagem de amostras positivas para cada um deles em relação ao número total de amostras positivas

Órgãos	Número de amostras positivas	% de amostras positivas
Óbex	01	6,7
Óbex e tonsila	01	6,7
Terceira pálpebra	02	13,3
Tonsila	11	73,3
TOTAL	15	100

Quanto à idade, houve animais positivos desde 2 anos até mais de 8 anos. O único animal com resultado positivo no óbex, tinha 7 anos e o positivo no óbex e

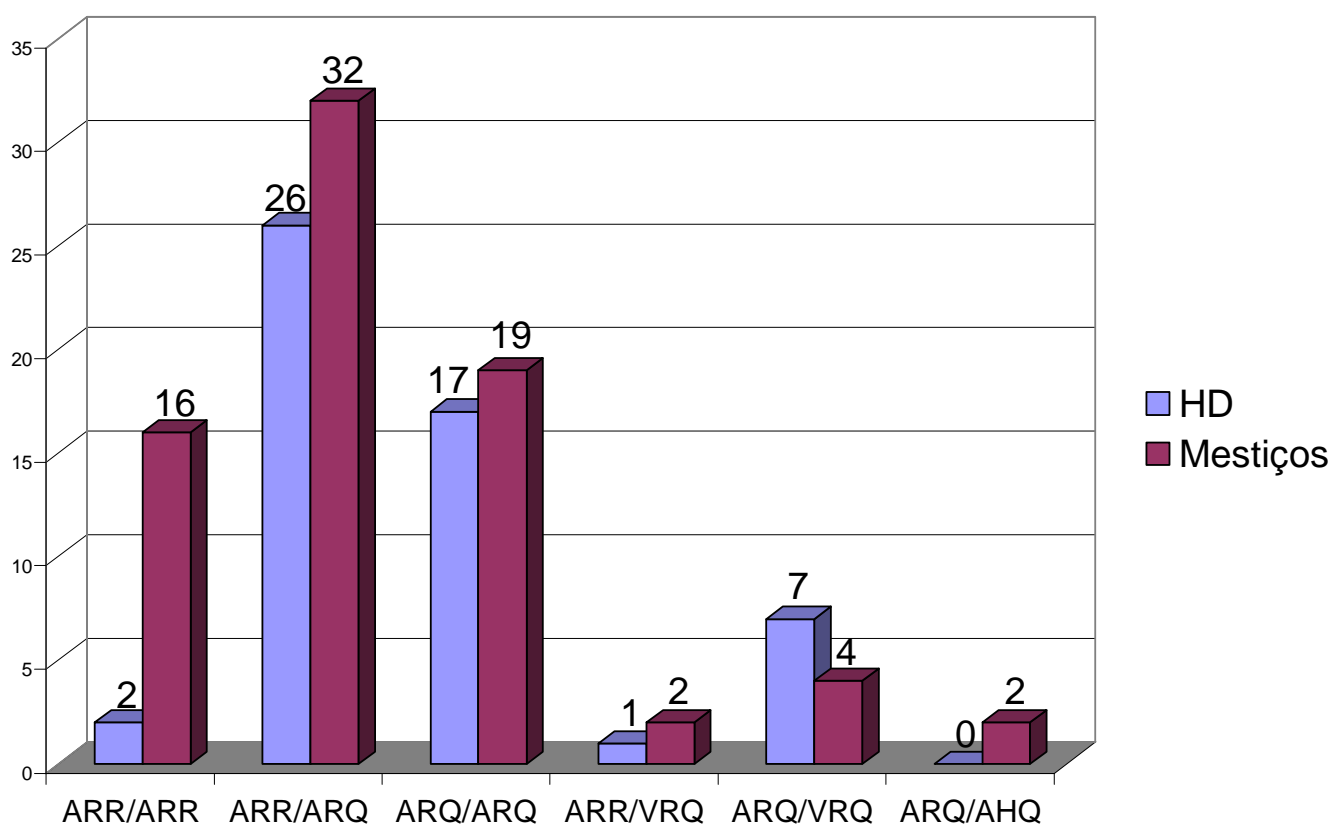
tonsila, 5 anos. Os dois animais com terceira pálpebra reativa, tinham 3 e 8 anos. Já no caso das tonsilas, onde houve o maior número de amostras positivas, a média de idade foi de 4,6 anos, variando desde apenas 2 anos a até 8 anos.

Entre os 15 animais que tiveram imunohistoquímica positiva, 6 (40%) eram de animais da raça Hampshire Down e 9 (60%) do rebanho mestiço, diferença não significativa estatisticamente ($p < 0,5$).

4.8 CORRELAÇÃO IHQ E GENOTIPAGEM

Do rebanho de animais potencialmente contaminados por scrapie, foram genotipados 128 animais, sendo seis genótipos encontrados: ARR/ARR; ARQ/ARQ; ARR/ARQ; ARR/VRQ; ARQ/VRQ e ARQ/AHQ (figura 20).

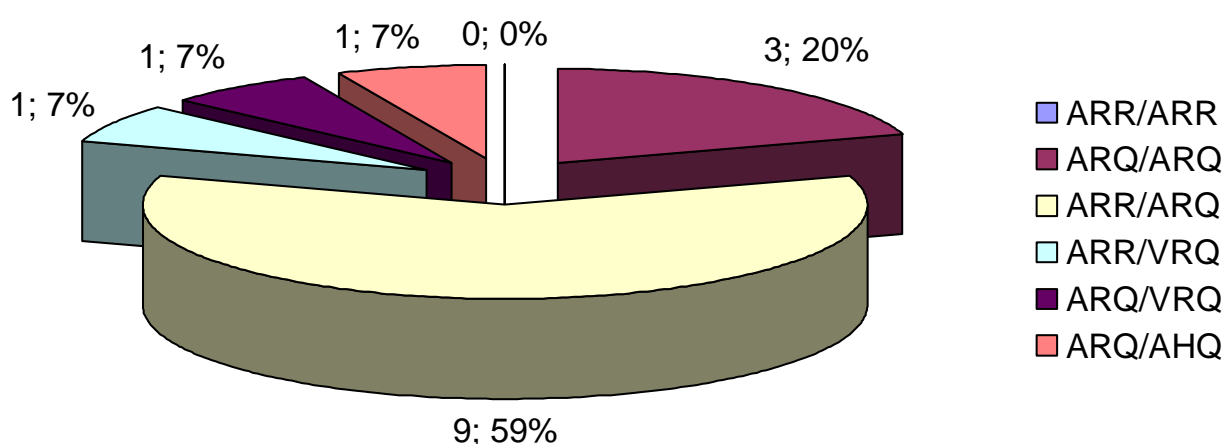
FIGURA 20 – Número de animais, de acordo com o genótipo e a raça (Hampshire Down - HD e mestiços) do rebanho potencialmente contaminado por scrapie



Quando se faz a correlação entre as análises da IHQ com o genótipo dos animais, observa-se que cinco genótipos encontrados nestes animais apresentaram amostras positivas para scrapie. Somente no genótipo ARR/ARR não houve casos de scrapie.

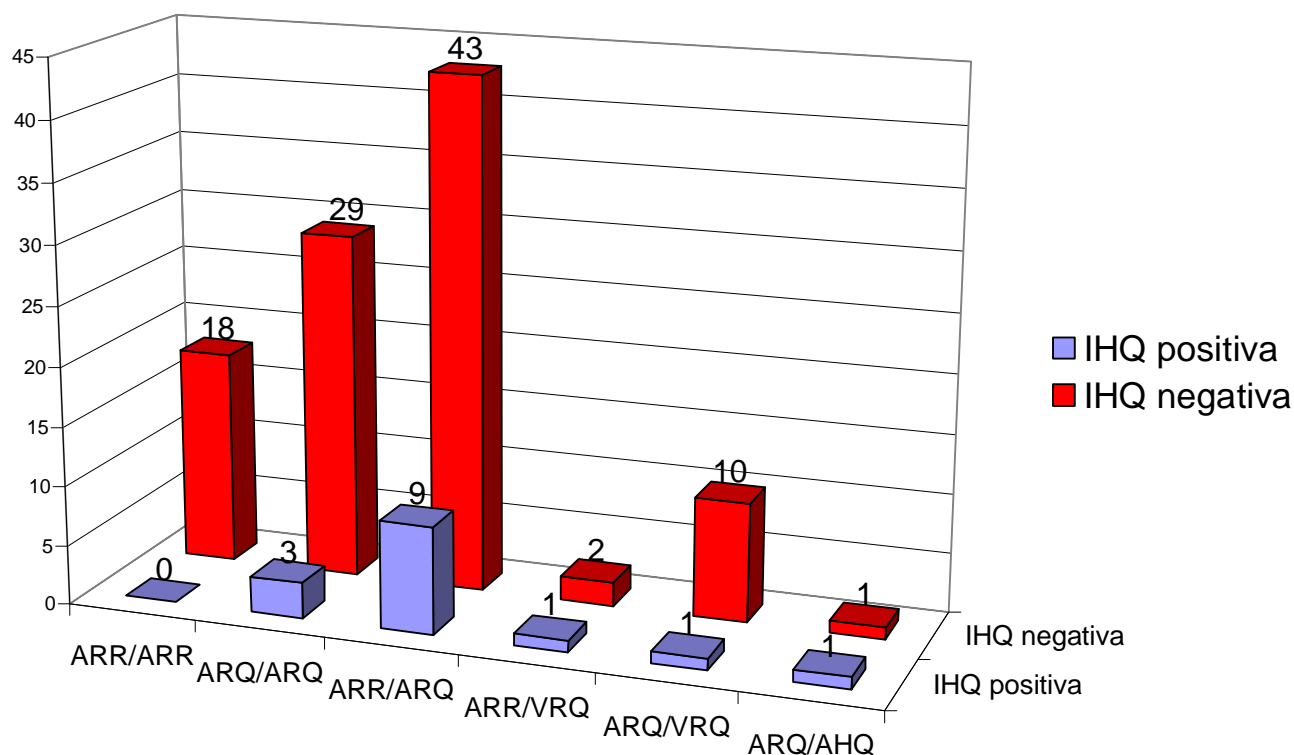
Dentre os 15 animais positivos, a maior porcentagem ocorreu no genótipo ARR/ARQ, representando 59% das amostras positivas, seguido pelo genótipo ARQ/ARQ com 20%. Os genótipos ARR/VRQ, ARQ/VRQ e ARQ/AHQ representaram 7% cada um (figuras 21).

FIGURA 21 – Número e porcentagem de ovinos com IHQ positiva (n=15) em relação aos seis genótipos encontrados no rebanho da PUCPR



Ao se comparar o número de amostras positivas e negativas num mesmo genótipo (figura 22), observa-se que, analisando em conjunto os dados do Hampshire Down e animais mestiços, não houve diferença significativa nos genótipos que apresentaram resultado positivo e negativo na IHQ.

FIGURA 22 – Número de amostras positivas e negativas para IHQ em relação aos seis genótipos encontrados no rebanho da PUCPR



A análise em dois grupos distintos, Hampshire Down e mestiços (tabela 16) mostra que há diferença estaticamente significativa ($p < 0,02$) quando se comparam os genótipos mais freqüentes encontrados nas amostras positivas e os mais freqüentes encontrados nas negativas dos animais mestiços. No caso dos dados dos animais da raça Hampshire Down, não se observa diferença estatística.

Quando se avalia cada genótipo individualmente, novamente não há diferenças no caso dos animais puros (tabela 16). Porém, para os mestiços, observa-se diferença significativa para os genótipos ARQ/ARQ ($p < 0,05$), que corresponde a 27,7% dos animais mestiços com resultado negativo para a IHQ e sem nenhum animal deste genótipo com reação positiva e para o grupo de animais ARR/ARQ, com 77,8% dos resultados positivos ($p < 0,02$). Para os demais genótipos, as diferenças não são estaticamente significativas.

TABELA 16 – Frequências genótípicas dos ovinos Hampshire Down (HD) e mestiços do rebanho da PUCPR, comparando os animais com IHQ positiva e negativa para a presença da PrP^{Sc}

Genótipo	HD IHQ negativa	HD IHQ positiva
ARR/ARR	4,9 ^a	0,0 ^a
ARQ/ARQ	29,3 ^a	50,0 ^a
ARR/ARQ	48,8 ^a	33,3 ^a
ARR/VRQ	2,4 ^a	0,0 ^a
ARQ/VRQ	14,6 ^a	16,7 ^a
ARQ/AHQ	0,0 ^a	0,0 ^a
Número de animais	41	6
χ^2	6,733	
p	ns	
Genótipo	Mestiços IHQ negativa	HD Mestiços IHQ positiva
ARR/ARR	24,6 ^a	0,0 ^a
ARQ/ARQ	27,7^a	0,0^b
ARR/ARQ	38,5^a	77,8^b
ARR/VRQ	1,5 ^a	11,1 ^a
ARQ/VRQ	6,2 ^a	0,0 ^a
ARQ/AHQ	1,5 ^a	11,1 ^a
Número de animais	62	9
χ^2	13,467	
p	p<0,02	

Obs.: ns - não significativa

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05)

5 DISCUSSÃO

Das amostras analisadas pelo método PCR-RFLP, 10 foram também genotipadas por meio de seqüenciamento e, em todas, os resultados dos genótipos foram os mesmos. Portanto, o método PCR-RFLP pode ser uma alternativa para a genotipagem, em especial quando não se trata de larga escala, principalmente quando não houver disponibilidade de seqüenciadores automáticos.

Uma vantagem da PCR-RFLP utilizada neste trabalho seria a possibilidade de diferenciar os cinco alelos comumente encontrados e também os 2 alelos raros (AHR e VRR) descritos em raças como Suffolk e Texel (KUTZER *et al.*, 2002; LÜHKEN *et al.*, 2004). Na presença destes dois alelos, ao utilizar as outras metodologias, alguns genótipos poderiam ser identificados incorretamente. Por exemplo, ao se encontrar o resultado AA₁₃₆ HR₁₅₄ QR₁₇₁, poderia ser ARR/AHQ ou ARQ/AHR. A vantagem da PCR-RFLP proposta é permitir a distinção entre todos os genótipos possíveis a partir da identificação dos 7 alelos. Além de ser eficiente, este método somente necessita de 2 reações de PCR, seguida da clivagem pelas enzimas de restrição e eletroforese em gel de agarose. Usando esta metodologia, porém, outros polimorfismos que podem ocorrer, mas que ainda não estão associados ao scrapie, poderiam passar despercebidos (LÜHKEN *et al.*, 2004).

Apesar dos muitos polimorfismos já identificados do gene PrP, para o scrapie clássico, considera-se que os códons 136, 154 e 171 são os únicos relacionados à maior resistência ou susceptibilidade ao scrapie. Além dos cinco alelos normalmente encontrados nos ovinos: ARR, ARQ, VRQ, AHQ, ARH (BELT *et al.*, 1995; DAWSON *et al.*, 1998), mais dois alelos, VRR e AHR, foram descritos nas raças Texel, Nolana e Suffolk, porém com freqüências tão baixas que são considerados raros (KUTZER *et al.*, 2002).

Ao analisar, em conjunto, os dados de todas as raças avaliadas neste trabalho dos 4 alelos observados (ARR; ARQ; VRQ; AHQ), 2 (ARR e ARQ) estavam presentes em todas as raças (tabela 13). A raça Damara não será considerada para esta e outras análises, porque somente dois animais foram genotipados, ambos sendo ARQ/ARQ. Dentre os dois alelos o ARQ foi o mais freqüente, exceto nas raças Crioula e Ile de France, onde o mais freqüente foi o ARR. A freqüência média do ARQ foi de 0,65, variando de 0,35 na raça Crioula a 0,80 na Dorper. Muitos

trabalhos, com diferentes raças e em diferentes países, também demonstram que o alelo ARQ é o mais freqüente:

MOLINA *et al.* (2006) – raça Merino – Espanha, freqüência alélica de 0,656;

LAN *et al.* (2006) – raças nativas – China, freqüência alélica de 0,752;

HURTADO *et al.* (2002) – raça Latxa – Espanha, freqüência alélica de 0,708;

SIPOS *et al.* (2002) – raças nativas – Áustria, freqüência alélica de 0,64 a 0,71;

ACÍN *et al.* (2004) – raças nativas – Espanha, freqüência alélica de 0,66 a 0,79 e

GAMA *et al.* (2006) – raças nativas – Portugal, freqüência alélica de 0,52 a 0,91.

Como este o alelo é considerado o ancestral, estes dados seriam esperados, principalmente em raças nativas, podendo indicar que, nestes rebanhos, não houve uma seleção intensa para novos polimorfismos do gene PrP.

A freqüência média do alelo ARR foi de 0,30, variando de apenas 0,07 na raça Dorper a 0,65 e 0,63 nas raças Crioula e Ile de France, respectivamente. A presença deste alelo em todas as raças é uma constatação bastante importante, porque deixa claro que, com cruzamentos direcionados, é possível em qualquer das raças avaliadas, obterem-se animais de genótipo ARR/ARR, que é considerado o mais resistente em todas as raças. Da mesma forma que para o alelo ARQ, há trabalhos com raças onde o ARR é o alelo mais freqüente:

GAMA *et al.* (2006) – raça Ile de France – Portugal, freqüência alélica de 0,81 e

EGLIN *et al.* (2005) – raça Suffolk – Grã Bretanha, freqüência alélica de 0,76.

Em alguns casos, há que se avaliar com cuidado os resultados de genotipagens que tenham sido realizadas em países, regiões, raças ou rebanhos onde já havia sido iniciado um programa de cruzamentos seletivos, porque a maior porcentagem de ARR já pode ser reflexo de cruzamentos seletivos com reprodutores ARR/ARR.

O alelo VRQ foi encontrado nas raças Dorper, Dorset, Hampshire Down, Santa Inês, Texel e em mestiços, mas em freqüências que não passaram de 0,13. DAWSON *et al.* (1998) classificam as raças como “raças A₁₃₆” ou “raças alanina” e “raças V₁₃₆” ou “raças valina”, separando aquelas raças que apresentam freqüências do alelo VRQ muito baixas, ou mesmo nula, daquelas com este alelo em taxas maiores. São consideradas “raças alanina”, entre as estudadas aqui, as raças Suffolk e Hampshire Down.

O alelo AHQ somente foi observado em animais da raça Santa Inês e nos mestiços, mas em freqüências muito baixas de 0,05 e 0,01, respectivamente. Este

alelo apresenta controvérsia quanto à sua capacidade de conferir resistência (BELT *et al.*, 1995; THORGEIRSDOTTIR *et al.*, 1999) ou susceptibilidade (HUNTER *et al.*, 1997b; DAWSON *et al.*, 1998; ELSEN *et al.*, 1999) aos seus portadores.

Em nenhum caso foi observado o alelo ARH. DeSILVA *et al.* (2003), analisando 1144 ovinos de diferentes raças nos EUA, entre elas Suffolk, Hampshire Down, Dorset e Dorper, encontraram somente 1 animal com o alelo ARH, cruzado das raças St. Croix e Dorper. Animais da raça Romney Marsh, da Nova Zelândia, também não apresentaram este alelo (BOSSERS *et al.*, 1999), o que mostra a baixa frequência deste alelo também em outras regiões e em diferentes raças.

Sete diferentes genótipos foram observados, sendo que apenas os genótipos ARQ/ARQ e ARR/ARQ foram encontrados em todas as raças (tabela 12). O genótipo ARR/ARR somente não foi encontrado na raça Santa Inês, ainda que esta tenha sido a raça com a maior variabilidade, e na raça Dorper. KUTZER *et al.* (2002) analisando 1108 ovinos de 33 raças também só encontraram como genótipos comuns a todas as raças os genótipos ARQ/ARQ; ARR/ARQ e ARR/ARR. O genótipo VRQ/VRQ, considerado o mais susceptível, não foi encontrado em nenhuma das raças aqui estudadas. Trabalhos em diferentes raças também relatam a ausência de animais VRQ/VRQ (BOSSERS *et al.*, 1999; HURTADO *et al.*, 2002; LAN *et al.*, 2006).

HUNTER *et al.* (1997a,b), nos primeiros estudos sobre genotipagens, observaram diferenças importantes quanto à frequência alélica e genotípica nas diferentes raças, inclusive quando se comparavam os genótipos mais frequentes em animais afetados ou não com scrapie, o que os levou a afirmar que havia uma evidente variação na frequência genotípica do PrP, que requer estudos adicionais em animais saudáveis. E acrescentam que, em surtos de scrapie, quanto maior o número de informações obtidas sobre os genótipos de ambos os grupos, acometidos ou não, principalmente nas raças ainda sem dados sobre o polimorfismo PrP, melhor será para o entendimento desta relação PrP – resistência.

Para uma melhor compreensão, os resultados da genotipagem observados no presente trabalho serão discutidos em cada raça separadamente.

SUFFOLK

Os dados encontrados para a raça Suffolk mostram a presença de apenas dois alelos ARR e ARQ. DAWSON *et al.* (1998) já tinham classificado a raça Suffolk dentro do grupo de raças que somente apresentam estes dois alelos e, ocasionalmente, o alelo ARH. A frequência genotípica na raça Suffolk de 0,65 para ARQ/ARQ; 0,25 para ARR/ARQ e 0,10 para ARR/ARR levanta a preocupação quanto à susceptibilidade ao scrapie, uma vez que em raças como a Suffolk, onde o alelo VRQ é raro ou ausente, o genótipo ARQ/ARQ está associado com o maior risco de scrapie (DAWSON *et al.*, 1998). HUNTER *et al.* (1997a) citam dados onde 100% dos animais com scrapie nos rebanhos estudados eram do genótipo ARQ/ARQ. Neste mesmo trabalho, os autores sugerem que a melhor forma de controlar o scrapie nesta raça seria o descarte de todos os animais QQ para o códon 171, visto que eles representavam apenas 14% dos animais sem scrapie e 100% dos afetados. Nos dados aqui apresentados, um controle baseado neste mesmo critério de descarte seria inviável, visto que 65% dos animais genotipados são ARQ/ARQ. Além disso, existe também a possibilidade de animais ARR/ARQ serem susceptíveis, ainda que em menor proporção. Nove casos de scrapie em Suffolk, na Alemanha, com genótipo conhecido, oito pertenciam ao alelo ARQ/ARQ e um ARR/ARQ (JUNGHANS *et al.*, 1998). Outros trabalhos relatam animais afetados por scrapie e com genótipo ARR/ARQ (HUNTER *et al.*, 1997b; IKEDA *et al.*, 1995).

A frequência de 0,25 do genótipo ARR/ARR observado neste trabalho é menor do que a maioria dos dados apresentados na literatura (0,43 - HUNTER *et al.*, 1997a; 0,48 - JUNGHANS *et al.*, 1998; 0,39 - O'DOHERTY *et al.*, 2000; 0,47 - DeSILVA *et al.*, 2003). O genótipo ARR/ARR é considerado o mais resistente ao scrapie clássico em todas as raças (DAWSON *et al.*, 1998).

EGLIN *et al.* (2005), numa revisão de dados do NSP, apresentam a genotipagem de mais de 36 mil ovinos da raça Suffolk, onde a frequência do alelo ARR é muito superior ao do ARQ (0,75 e 0,24, respectivamente). Houve ainda uma frequência muito baixa de ARH (0,01) e VRQ (0,002) confirmando que esta raça é predominantemente de alelos ARR e ARQ.

Dados da Alemanha (KUTZER *et al.*, 2002) mostram frequências genotípicas próximas às obtidas neste trabalho, sendo o genótipo ARQ/ARQ o mais frequente com 0,54, seguido pelo ARR/ARQ com 0,21 e somente 0,15 para o genótipo

ARR/ARR. Os autores comentam que a baixa frequência do genótipo ARR/ARR pode representar um obstáculo para programas de cruzamentos seletivos para a resistência ao scrapie. Dados americanos também mostram esta ordem decrescente de frequências para estes três genótipos ARQ/ARQ>ARR/ARQ>ARR/ARR, 0,56, 0,37 e 0,04, respectivamente (O'ROURKE *et al.*, 1996) assim como dados japoneses, 0,70; 0,19; 0,09 (IKEDA *et al.*, 1995). Nestes trabalhos, frequências muito baixas (0,007 a 0,046) de outros genótipos também foram encontradas. O'DOHERTY *et al.* (2000), analisando dados da raça Suffolk na Irlanda, comparam a frequência genotípica de animais desta raça em diferentes países, encontrando uma relação de predominância do genótipo QQ₁₇₁ nos dados americanos quando comparados com os irlandeses, britânicos e alemães. Porém, dados de 232 Suffolk do Estado de Oklahoma, mostram uma maior frequência do genótipo ARR/ARQ (56%), enquanto que os animais ARQ/ARQ representam 22% do rebanho, assim com os animais com genótipo ARR/ARR (DeSILVA *et al.* 2003).

Dados brasileiros preliminares, genotipando apenas o códon 171 de dois rebanhos de ovinos Suffolk do Rio Grande do Sul, mostram que apenas 1,3% dos animais eram RR, 47,9% eram QR e 50,6% QQ (RIBEIRO *et al.* 2005).

A raça Suffolk tem importância histórica no Estado do Paraná. Na década de 80, foi a raça mais criada pelos ovinocultores de cabanha, ou seja, de animais de raça pura. Muitas importações foram realizadas, principalmente dos Estados Unidos, onde o scrapie é uma doença endêmica (DETWILER e BAYLIS, 2003). Desde o primeiro caso relatado, em 1947, aproximadamente 1.600 ovinos e 7 caprinos foram diagnosticados com scrapie nos EUA até 2002 (DeSILVA *et al.* 2003). Segundo WESTAWAY *et al.* (1994) nos EUA, 86,4% dos casos de scrapie ocorrem em ovinos da raça Suffolk.

Uma vez que os casos de scrapie nos rebanhos paranaenses da raça Suffolk eram continuamente negligenciados, pode-se levantar a hipótese que os animais ARQ/ARQ eram a maioria dos casos de scrapie. Estes animais durante sua vida reprodutiva certamente deixaram descendentes e estes permaneciam nos rebanhos sem qualquer tipo de restrição. Caso houvesse acontecido algum tipo de restrição a esses animais acometidos, ao longo do tempo, poder-se-ia imaginar uma diminuição da frequência do alelo ARQ, o que aparentemente não aconteceu. ELSEN *et al.* (1999) mostram a nítida mudança que ocorre em rebanho com scrapie quanto à

reposição dos genótipos: enquanto os genótipos mais susceptíveis diminuem (pela seleção natural, dos que morrem de scrapie), a tendência dos genótipos mais resistentes é aumentar. Analisado por este aspecto, poder-se-ia também supor que os rebanhos de Suffolk estudados aqui não devem ter tido muitos casos de scrapie (não notificados), visto que a porcentagem de animais susceptíveis é maior do que a de resistentes. A suposição de rebanhos sem scrapie ou com baixa incidência pode ser verdadeira, porém, há que se considerar um fator que, no caso da raça Suffolk, foi bastante marcante neste trabalho. Muitos criadores contactados não permitiram a colheita de sangue de seus animais. Houve casos, inclusive, de criadores que permitiram a colheita de sangue de animais de outra raça criada na propriedade e não dos animais Suffolk. Isto poderia refletir uma tendência a não incluir rebanhos que anteriormente tiveram casos de scrapie, podendo justificar esta alta porcentagem de genótipos susceptíveis.

HAMPSHIRE DOWN (HD)

DAWSON *et al.* (1998) também classificam a raça Hampshire Down dentro do grupo de “raças alanina”, que somente apresentam os alelos ARR e ARQ e, ocasionalmente, o alelo ARH. A presença do alelo VRQ é rara. Neste trabalho, ainda que em frequência baixa (0,06), o alelo VRQ está presente na raça HD, formando os genótipos ARR/VRQ e ARQ/VRQ, com 2% e 10%, respectivamente. A presença de 10% de animais ARQ/VRQ, que é um dos genótipos mais susceptíveis ao scrapie (somente o VRQ/VRQ é considerado mais susceptível) inspira preocupação, pois se tratam de animais em risco, se em contato com o agente causador do scrapie. Ainda, a presença de 43% do rebanho com genótipo ARQ/ARQ, considerado o mais susceptível em raças valina, e a baixa porcentagem de animais ARR/ARR (somente 5%), aumentam a preocupação.

EGLIN *et al.* (2005), na análise de dados de 2158 animais do NSP, registrou a presença dos alelos ARR e ARQ, em frequências próximas, 54,9% e 45%, respectivamente. Não foram encontrados os alelos ARH, AHQ e VRQ. Dados de animais dos Estados Unidos também encontraram somente os alelos ARR e ARQ, sendo o genótipo mais freqüente o ARR/ARQ, 48%, seguido pelo genótipo ARQ/ARQ com 24% e ARR/ARR com 19% (DeSILVA *et al.*, 2003).

No Estado do Paraná, animais da raça HD, assim como a Suffolk, também foram importados dos EUA na década de 80, ainda que em menor número. Os casos de scrapie em ovinos notificados no Paraná em 2000, 2001 e 2003 eram todos de animais da raça HD, mostrando que realmente há animais bastante susceptíveis. Por mais que se saiba, mesmo que não oficialmente, que o número de casos de scrapie no Paraná sempre foi maior na raça Suffolk, isto poderia ser reflexo simplesmente do maior número de animais desta raça criados naquela época.

TEXEL

Na classificação de DAWSON *et al.* (1998), a raça Texel figura entre aquelas que apresentam a maior variabilidade genética, normalmente sendo encontrados todos os alelos e genótipos, confirmado por outros trabalhos (BELT *et al.*, 1995; O'DOHERTY *et al.*, 2002; KUTZER *et al.*, 2002; BAYLIS *et al.*, 2002). EGLIN *et al.* (2005), utilizando dados do NSP, apresentam a genotipagem de mais de 51 mil ovinos da raça Texel, com a presença de todos os alelos. A maior frequência foi do alelo ARH, com 43,7%, seguido pelo ARR, com 33,4% e pelo ARQ, com 15,3%. Já os alelos AHQ e VRQ apresentaram frequências baixas, com 4,2% e 3,4%, respectivamente. BAYLIS *et al.* (2002) encontraram frequências alélicas, num rebanho de 230 texel, de 22,7%; 1,3%; 50,9%; 17,4% e 7,7%, respectivamente para ARR, AHQ, ARQ, ARH e VRQ.

Nos animais avaliados neste trabalho, foram encontrados somente os alelos ARQ (0,63); ARR (0,31) e VRQ (0,06) e os genótipos ARQ/ARQ (0,44); ARR/ARQ (0,25); ARR/ARR (0,19) e ARQ/VRQ (0,13) demonstrando uma menor variabilidade. JUNGHANS *et al.* (1998) ao analisarem 35 animais da raça Texel de 3 diferentes rebanhos na Alemanha, apesar desta raça ter apresentado a maior variabilidade entre as raças avaliadas, também não encontraram o alelo AHQ.

No Paraná a raça Texel vem crescendo em número de animais, principalmente como raça terminal. Suas características de carcaça, considerada como uma das melhores das raças de corte em ovinos, têm atraído a atenção dos ovinocultores paranaenses, que antes praticamente só utilizavam a raça Suffolk.

ILE DE FRANCE

A raça Ile de France apresentou somente os alelos ARR e ARQ, com freqüências de 0,63 e 0,37, respectivamente. Em comparação com as outras raças de corte, foi a que teve a maior freqüência do alelo ARR (0,63) e do genótipo ARR/ARR (0,33). O genótipo ARR/ARQ foi encontrado em 58% dos animais e o ARQ/ARQ em somente 8%. GAMA *et al.* (2006) encontraram freqüências alélicas, numa amostragem de 60 animais vindos de 22 rebanhos diferentes, de 0,808; 0,042; 0,150; respectivamente para ARR, ARQ, VRQ. Não foram encontrados os alelos ARH e AHQ. Quanto à freqüência genotípica, os resultados foram: ARR/ARR: 0,650; ARR/ARQ: 0,067; ARR/VRQ: 0,250; ARQ/VRQ: 0,017 e VRQ/VRQ: 0,017.

Neste trabalho, a raça Ile de France foi a que proporcionalmente teve o maior número de amostras obtidas de rebanhos diferentes (11 rebanhos para 12 animais genotipados), sendo que estas amostras talvez sejam as que melhor representem a raça no rebanho paranaense. Portanto, estas porcentagens de genótipos mais resistentes indicam que a Ile de France seria a raça que disporia de mais reprodutores para programas de cruzamentos seletivos visando aumentar a resistência ao scrapie.

DORSET

Os dados da genotipagem de animais desta raça são procedentes de apenas um criador e por isso devem ser analisados com cuidado. O alelo mais freqüente é o ARQ (0,75), seguido do ARR (0,22) e do VRQ (0,03). O genótipo mais freqüente foi o ARQ/ARQ, encontrado em 56% dos animais, depois o ARR/ARQ, em 31%. O genótipo mais resistente ARR/ARR aparece com a freqüência de 6%, a mesma que um dos mais susceptíveis, ARQ/VRQ.

EGLIN *et al.* (2005) analisando os dados de 5 mil ovinos da raças Dorset e Poll Dorset do NSP, verificaram que a freqüência do alelo ARR foi de 0,605, do alelo ARQ foi de 0,284 e do alelo VRQ, de 0,102. O alelo AHQ teve apenas 0,009 e o ARH apenas 0,001. Os dados de pesquisas americanas são mais próximos dos encontrados neste trabalho, com 38,7% dos animais possuindo ARR/ARQ e também ARQ/ARQ, sendo que a porcentagem de animais ARR/ARR é de apenas 9,7%. Há ainda a presença de 8,1% de animais ARR/VRQ e 1,6% ARQ/VRQ (DeSILVA *et al.*, 2003). A origem dos Dorset encontrados no Paraná é dos EUA. Quando começaram

as importações desta raça, houve a proibição de importações dos EUA, exatamente em função do scrapie. Isto ocasionou que poucos animais formassem o rebanho base, o que pode sugerir um índice maior de consangüinidade nesta raça.

DORPER

A raça Dorper, de origem sul-africana, foi recentemente introduzida no Brasil. No Paraná o rebanho ainda é pequeno, mas vem despertando o interesse dos criadores, que têm buscado esta raça como alternativa para a criação de animais puros (de cabanha), em função dos altos preços conseguidos.

Nesta raça, novamente o alelo ARQ apresentou a maior freqüência, com 0,80. O segundo mais freqüente foi o alelo VRQ com 0,13 e o ARR apresentou freqüência de apenas 0,07. Quanto aos genótipos, não foi encontrado o genótipo ARR/ARR, o ARQ/ARQ representou 63% dos animais e os genótipos com pelo menos um alelo VRQ chegam a 26% das amostras. Esta foi a raça que apresentou a maior porcentagem de animais com genótipos mais susceptíveis.

Dados sobre esta raça ainda são escassos na literatura. DeSILVA *et al.* (2003) citam alguns dados de animais cruzados com Dorper, mas apresenta estes dados em conjunto com outras raças de pêlo, como St. Croix e Katahdin, o que inviabiliza uma comparação com os dados deste trabalho.

CRIOULA

A raça crioula é uma raça nativa, bastante criada no Rio Grande do Sul, e ainda presente em rebanhos paranaenses, cruzada com raças especializadas para corte. Apesar da baixa produtividade, esta raça normalmente é bastante rústica. Os resultados da genotipagem são interessantes, pois foi a raça avaliada que apresentou a maior porcentagem de animais ARR/ARR (50%), considerado o mais resistente ao scrapie. Normalmente o alelo mais encontrado em raças nativas é o ARQ (SIPOS *et al.*, 2002; LAN *et al.*, 2006; ACÍN *et al.*, 2004; GAMA *et al.*, 2006). Nos animais estudados, por se tratar de um único rebanho, talvez tenha ocorrido cruzamentos consangüíneos, que levam à homozigose, ou a seleção para o alelo ARR está correlacionada a alguma outra característica específica deste rebanho.

SANTA INÊS

A raça Santa Inês, assim como os animais mestiços, apresentou a maior variabilidade encontrada neste trabalho, apresentando os 4 alelos e 6 dos 7 genótipos encontrados. O alelo mais freqüente foi o ARQ, com 0,66, seguido pelo ARR, com 0,20. O alelo VRQ aparece com freqüência de 0,09 e o AHQ com 0,05. A presença de 43% de animais ARQ/ARQ, 11% ARQ/VRQ e nenhum animal ARR/ARR, demonstram que esta raça apresenta uma grande porcentagem de animais com genótipos muito susceptíveis ao scrapie. Por se tratar de uma raça brasileira, não existem muitos dados publicados sobre genotipagem em animais Santa Inês. LIMA (2002) apresentou o resultado de 24 animais do Estado do Ceará. Os resultados encontrados foram bastante parecidos, não tendo sido encontrado o alelo ARH e ocorrendo seis genótipos: ARR/ARR, AHQ/ARR, ARQ/ARR, AHQ/ARQ, ARQ/ARQ e ARR/VRQ. Houve predominância dos genótipos ARQ/ARQ (37,5%), ARQ/ARR (25%) e ARR/ARR (16,7%).

O maior rebanho de animais Santa Inês está no Nordeste. Esta raça vem despertando também um grande interesse em Estados de outras regiões do Brasil, em função de características desta raça, como ausência de sazonalidade, rusticidade, resistência a verminoses (ROCHA *et al.*, 2004; BRICARELLO *et al.*, 2005).

Se o scrapie sempre foi mais presente em rebanhos no Paraná em raças como o Suffolk e HD, a introdução de raças como a Santa Inês, com um perfil de genótipos susceptíveis ao scrapie, pode ser um fator de preocupação. Da mesma forma, esta raça vem sendo melhorada com o objetivo de se tornar um material de exportação do Brasil, o que poderia ser comprometido pela baixa resistência genética ao scrapie, quando em contato com o agente.

MESTIÇOS

Os animais mestiços genotipados eram todos provenientes do rebanho da PUCPR, sendo resultado do cruzamento de animais das raças Texel, Ile de France, Hampshire Down e mesmo animais sem raça definida (SRD). O que se observa nos resultados é grande variabilidade, assim como na raça Santa Inês, estando presente os 4 alelos e 6 genótipos. Os alelos mais freqüentes foram o ARQ e o ARR, com respectivamente 0,51 e 0,44, e os alelos VRQ e AHQ aparecem em freqüências muito baixas, 0,04 e 0,01 respectivamente.

Sendo os alelos mais freqüentes o ARQ e ARR, os genótipos mais encontrados foram o ARR/ARQ, em 43% do rebanho, seguido pelo ARQ/ARQ em 25% e o ARR/ARR em 21%. Já os genótipos ARR/VRQ, ARQ/VRQ e ARQ/AHQ aparecem, cada um, em menos de 5% das amostras. Não existem na literatura brasileira dados de animais mestiços que possam ser comparados a estes.

Na produção moderna, não se medem esforços para buscar animais geneticamente resistentes a enfermidades. Atualmente, em ovinos, há várias doenças em que já se pratica a seleção para resistência: scrapie, foot-rot, mastite, paratuberculose, dermatofilose, salmonelose, nematodioses e míiase cutânea (BISHOP, 2006).

Toda a característica, porém, para poder ser utilizada como critério de seleção para cruzamentos tem que estar baseada num fundamento genético. Segundo BISHOP (2006) se a doença não está presente, não se pode dizer se um animal é resistente ou não. Ainda que numerosos trabalhos demonstrem a relação genótipo e resistência/susceptibilidade ao scrapie, muitos dados evidenciam as diferenças que há entre raças e rebanhos, deixando claro que os critérios para a seleção não necessariamente podem e devem ser aplicados igualmente para ovinos de diferentes raças, rebanhos ou países (LÜHKEN *et al.*, 2004; ACÍN *et al.*, 2004). No intuito de facilitar o desenho de programas de controle, existem classificações agrupando os genótipos em classes de susceptibilidade (DAWSON *et al.*, 1998; DEFRA, 2003). Geralmente, o critério utilizado para colocar um genótipo numa classe e não em outra não está explícito, e diferentes esquemas podem classificar o mesmo genótipo de forma distinta. Assim, na Grã Bretanha, segundo DAWSON *et al.* (1998), o genótipo AHQ/VRQ é alocado na classe onde “o scrapie pode ser ocasionalmente encontrado”, porém é definido como “altamente susceptível ao scrapie” no NSP também da Grã Bretanha. Muitos outros exemplos seriam possíveis. Para as raças nativas brasileiras e para animais oriundos de cruzamentos de diferentes raças, somente após a constatação de rebanhos contaminados e associando-se a presença ou não da PrP^{Sc} a determinados genótipos, poder-se-ia afirmar que um genótipo é mais resistente ou susceptível ao scrapie. Mesmo para raças com dados de outros países, os critérios utilizados nos cruzamentos realizados aqui no Brasil podem ter selecionado alelos e polimorfismos distintos.

Existe ainda a possibilidade de cepas distintas de scrapie (GOLDMANN *et al.*, 1994; DAWSON *et al.*, 1998), que podem apresentar diferenças em relação à susceptibilidade ou resistência a determinados genótipos.

O rebanho de ovinos da Fazenda Experimental Gralha Azul da PUCPR apresentou 3 casos de animais com scrapie, entre os anos de 2003 e final de 2004 (POHL DE SOUZA *et al.*, 2005). A presença de animais clinicamente afetados, com a posterior confirmação por exames histopatológicos e imunohistoquímicos, tornou este rebanho potencialmente contaminado por scrapie. A possibilidade de abate dos animais em abril de 2006 permitiu o primeiro estudo de caso relacionando genótipo e resistência ao scrapie em rebanho ovino no Brasil.

As três ovelhas clinicamente afetadas eram puras da raça Hampshire Down e tinham entre 6 e 6,5 anos quando apresentaram os primeiros sinais clínicos do scrapie. Eram animais provenientes de uma mesma propriedade e que haviam sido introduzidas no plantel da PUC quando tinham entre 1 e 2 anos de idade. O primeiro sinal observado foi o prurido, que se intensificou durante o período em que estas ovelhas foram observadas. Exceto nos casos de scrapie atípico (BENESTAD *et al.*, 2006), o prurido é um dos sinais mais comuns do scrapie (ELSEN *et al.*, 1999). VARGAS *et al.* (2005) acompanharam 24 animais durante toda a fase clínica do scrapie e observaram prurido em 70,8% deles. COCKCROFT e CLARK (2006) numa compilação de 574 casos confirmados na Islândia observaram o prurido em 61% dos casos. Ainda que o prurido seja mais freqüente na região lombar, também pode ser observado na cabeça, tórax e nas faces interna e externa dos membros posteriores (VARGAS *et al.*, 2005). Muitas vezes, é identificado de forma indireta, pela perda de lã ou pela indução do reflexo de mordiscar (do termo em inglês *nibbling*), que é um movimento característico de lábios e língua quando os animais são estimulados na região lombar. Concomitante ao prurido, era possível observar alterações de comportamento, como apatia, dificuldade de deambulação. ELSEN *et al.* (1999) também encontraram como primeiros sinais a incoordenação motora. Estas alterações de comportamento são bastante comuns, podendo ser caracterizada também por sinais excitatórios como inquietude, ansiedade e evitar a contenção (VARGAS *et al.*, 2005).

Não foi observada emaciação importante em nenhum dos animais e apenas o último animal apresentou uma progressiva dificuldade em manter-se em estação.

Duas das três ovelhas começaram a apresentar os sinais clínicos após o parto, estando de acordo com COCKCROFT e CLARK (2006) que destacam que períodos de stress podem coincidir com o início dos sinais clínicos.

A análise por IHQ de tecidos e órgãos de todos os animais do rebanho da PUCPR, onde estes casos de scrapie foram diagnosticados, permitiu fazer uma associação entre os genótipos encontrados neste rebanho e a presença ou não de reação positiva no teste de IHQ.

De 118 animais abatidos e testados, 15 apresentaram reação positiva, sendo que 6 eram Hampshire Down puros (12,8% de 47 animais puros examinados) e 9 eram mestiços (12,7% de 71 animais mestiços examinados). Todos os animais, quando abatidos, não apresentavam nenhum sinal clínico. BILLINIS *et al.* (2004), também testando animais saudáveis de um rebanho onde houve casos positivos de scrapie, encontraram 25% de animais em fase latente (sem sinais clínicos) em relação aos clinicamente saudáveis. TONGUE *et al.* (2005), num levantamento da prevalência de scrapie em 14 rebanhos, cujos animais foram abatidos após a confirmação de casos de scrapie, estimaram a prevalência em 6,6%, variando entre zero a 15,4%. A preocupação pela presença destes ovinos assintomáticos, mas portadores do PrP^{Sc}, é que estes animais podem estar disseminando o agente por longos períodos, antes que casos clínicos de scrapie possam ser detectados no rebanho.

Nos 15 casos confirmados, de todos os tecidos e órgãos examinados, a tonsila foi a que apresentou a maior porcentagem de reação positiva (73,3%). ANDRÉOLETTI *et al.* (2000), analisando cordeiros naturalmente infectados, também encontraram que o maior nível de PrP^{Sc} foi detectado nas tonsilas, reativas desde os 3 meses de idade. Neste mesmo trabalho, não foram observados animais clinicamente afetados, mesmo naqueles sacrificados aos 9 meses de idade e com reações positivas para todos os tecidos linfóides examinados, exceto o timo. Em outro trabalho, SCHREUDER *et al.* (1998) já haviam relatado o acúmulo do PrP^{Sc} em biópsias de tonsilas palatinas em ovinos Texel VRQ/VRQ de 4 meses de idade, mais de 20 meses antes da ocorrência de sinais clínicos, o que corrobora com nossos resultados.

Interessante observar que dos 15 animais, somente 2 apresentaram resultado positivo no óbex, mesmo em animais de mais de 6 anos. No caso dos animais

introduzidos no rebanho, isto poderia ser decorrente de uma contaminação mais tardia, ainda que a entrada destes animais tenha ocorrido em 2002, para parte do lote, e outra parte em 2003. ERSDAL *et al.* (2003) encontraram 17 animais adultos positivos entre 48 avaliados, todos sem nenhum sinal clínico, oriundos de um rebanho onde houve 2 casos de scrapie. Destes positivos, havia dois animais VRQ/VRQ de 7 anos de idade e outros 3 animais, com 15 meses e 24 meses, que apresentavam resultado positivo somente para o linfonodo retrofaríngeo medial. Os autores sugerem, assim como se cogita no caso da PUC, que este lento desenvolvimento da doença nestes animais poderia ser em decorrência de infecção quando adultos, ou ainda que estes animais tivessem sido expostos a uma dose infectante inicial muito pequena.

Uma possível explicação para a disseminação mais lenta do PrP^{Sc} quando animais adultos são contaminados, seria o importante papel das placas de Peyer do íleo. Em infecções experimentais, HEGGBO *et al.* (2003) mostraram que 5 semanas após o desafio, cordeiros dos genótipos susceptíveis já apresentavam coloração nas placas de Peyer, indicando a importante participação deste tecido linfóide na absorção e disseminação do agente do scrapie. Se a infecção ocorrer após a involução deste órgão (que ocorre por volta dos 18 meses de idade), pode ser menos efetiva e levar a um desenvolvimento mais lento da doença (ERSDAL *et al.*, 2003).

ROELS *et al.* (1999), avaliando 105 animais por IHQ após 6 casos positivos de scrapie no rebanho, encontraram em animais sem nenhuma sinal clínico, 3 positivos na IHQ para tonsila e óbex e 3 animais positivos somente para tonsila, todos sem nenhuma lesão histopatológica. Estes autores afirmam que a presença de PrP^{Sc} no SNC precede, portanto, as lesões histopatológicas e sinais clínicos e que a PrP^{Sc} pode ser detectada nas tonsilas na ausência de PrP^{Sc} no SNC.

Nos casos de scrapie natural, o trato gastrointestinal é considerado a principal via de transmissão (ANDRÉOLETTI *et al.*, 2000; ERSDAL *et al.*, 2003) e a contaminação ambiental se dá, até onde se conhece, por meio de placenta e fluidos fetais infectantes (ANDRÉOLETTI *et al.*, 2002; DETWILER e BAYLIS, 2003; TOUZEAU *et al.*, 2006). No rebanho da PUCPR, os três casos clínicos ocorridos foram de ovelhas que haviam parido na propriedade. Nos anos de 2000, 2001 e

2002, as três ovelhas pariram e, nos anos de 2003 e 2004, somente duas, pois uma delas já havia sido sacrificada.

Sabe-se que durante o período de incubação do scrapie, ovelhas dos genótipos susceptíveis acumulam grandes quantidades de PrP^{Sc} e podem disseminar o agente por meio da placenta já na primeira gestação, muito antes do início dos sinais clínicos da doença (ANDRÉOLETTI *et al.*, 2002). Das três ovelhas com sinais clínicos, somente a última foi genotipada e apresentava o genótipo ARQ/ARQ, considerado o mais susceptível para a raça Hampshire Down. Pode-se presumir que todas as três ovelhas já vinham eliminando o agente antes do aparecimento dos sinais clínicos. Portanto, a infecção de todos os animais nascidos na propriedade provavelmente aconteceu logo após o nascimento, devido ao ambiente contaminado.

RYDER *et al.* (2004) trabalhando com a introdução de ovinos adultos e livres de scrapie em rebanhos contaminados, demonstraram a possibilidade de transmissão lateral em animais adultos. Este trabalho também revela que, ainda que animais jovens possam ser mais susceptíveis ao scrapie que animais adultos, os ovinos são susceptíveis à infecção em várias idades, inclusive na idade adulta. Estes dados corroboram os resultados encontrados no presente trabalho, onde animais nascidos em outras propriedades e introduzidos no rebanho contaminado tornaram-se positivos na IHQ. Do rebanho mestiço, 33 (44,0%) chegaram com mais de 1 ano no rebanho e, destes, 6 animais foram positivos na IHQ, indicando que 18,2% dos animais introduzidos no rebanho se contaminaram provavelmente quando adultos. Não se pode descartar a possibilidade de contaminação na propriedade de origem destes animais, uma vez que o histórico de não existência da doença pode não ser suficiente para tal afirmação. O mesmo acontece com os animais Hampshire Down que não eram nascidos na propriedade. Eram 4 ovelhas e 1 carneiro. Das ovelhas, uma delas foi a última que apresentou a doença clínica e outras 2 foram positivas para IHQ. Fica difícil saber se a contaminação ocorreu quando adultas, ao chegarem no ambiente contaminado, ou na propriedade de origem, uma vez que estas ovelhas e as outras que morreram de scrapie, eram da mesma propriedade.

Na análise dos genótipos associados ao acúmulo de PrP^{Sc} (tabela 16), observa-se que em todos os genótipos encontrados no rebanho, exceto no

ARR/ARR, houve a presença de PrP^{Sc} quando se avaliam os resultados de animais puros HD e mestiços em conjunto. Em todos os relatos de scrapie clássico até o momento, somente um animal ARR/ARR no Japão, da raça Suffolk (IKEDA *et al.*, 1995), está associado à infecção natural de scrapie. Portanto, considera-se que a susceptibilidade do genótipo ARR/ARR aos agentes causadores do scrapie clássico atualmente circulantes é extremamente baixa, senão nula (HUNTER, *et al.*, 1997a; ELSEN *et al.*, 1999; THORGEIRSDOTTIR *et al.*, 1999; TRANULIS *et al.*, 1999; ACÍN *et al.*, 2004; BILLINIS *et al.*, 2004).

ANDRÉOLETTI *et al.* (2000) encontraram, na fase clínica da doença, que o PrP^{Sc} foi detectado tanto no SNC quanto nos tecidos linfóides em animais VRQ/VRQ. Por outro lado, em animais VRQ/ARR, a deposição de PrP^{Sc} ocorreu somente no SNC. Outros autores também relataram dados semelhantes em infecções naturais em ovinos Texel (VAN KEULEN *et al.*, 1996; SCHREUDER *et al.*, 1996, 1998), levando-os a sugerir que ovinos carregando um alelo ARR não acumulariam PrP^{Sc} nos tecidos linfóides (ANDRÉOLETTI *et al.*, 2000). Estes dados estão em desacordo com os resultados encontrados neste trabalho, onde foi observado que em 66,67% dos resultados positivos era de animais heterozigotos para o alelo ARR e que todos apresentavam reação positiva na IHQ da tonsila. No trabalho de ERSDAL *et al.* (2003) também foi encontrado um cordeiro ARR/VRQ positivo para IHQ na placa de Peyer aos 86 dias de vida, idade também encontrada para outro cordeiro VRQ/VRQ, indicando que mesmo na presença do alelo ARR pode haver acúmulo do prion nos tecidos linfóides.

Ao analisar os dados dos genótipos dos animais HD e mestiços em separado, observam-se diferenças. Os genótipos dos animais HD deste trabalho com casos positivos foram o ARQ/ARQ (50% dos casos), ARR/ARQ (33,3%) e ARQ/VRQ (16,7%). A raça HD é tida como uma raça valina (DAWSON *et al.*, 1998), onde a presença do alelo VRQ é rara ou mesmo inexistente. Nestas raças valina, ainda que o maior número de trabalhos seja com a raça Suffolk, o genótipo ARQ/ARQ é considerado o mais susceptível ao scrapie (DAWSON *et al.*, 1998; HUNTER *et al.*, 1997a), sendo que para o genótipo ARR/ARQ há resultados que propõem maior resistência (O'ROURKE *et al.*, 1997) e outros susceptibilidade (IKEDA *et al.*, 1995; HUNTER *et al.*, 1997b; JUNGHANS *et al.*, 1998). Neste trabalho, os animais de genótipo ARQ/ARQ do grupo com presença do prion e sem a presença não diferiram

estatisticamente, ainda que sendo encontrado mais animais positivos que negativos com este genótipo. No grupo de animais ARR/ARQ, também não houve diferença significativa, porém foram encontrados mais animais negativos que positivos com este genótipo. Em princípio, a presença do alelo ARR não foi suficiente para impedir o do acúmulo do prion, sendo que a susceptibilidade do alelo ARQ prevaleceu.

Nos dados dos HD da PUC, ainda é possível observar que o alelo VRQ teve uma frequência de 0,07. Observa-se que este alelo, quando associado ao ARR não demonstrou a presença do prion. Já quando associado ao ARQ, apresentou resultado positivo. Trabalhos mostram esta diferença da associação do alelo VRQ ao alelo ARR indicando menor risco de scrapie, em contrapartida, quando em conjunto com o alelo ARQ o risco é maior (O'DOHERTY *et al.*, 2002; BAYLIS *et al.*, 2004).

Na análise dos animais mestiços, avaliando os genótipos como um todo e comparando o grupo de IHQ positiva e negativa, observa-se diferença estatística significativa ($p < 0,02$), indicando que o genótipo teve influência no aparecimento de casos positivos. Aparentemente há uma inversão dos alelos quanto à susceptibilidade. Nenhum caso positivo é encontrado no genótipo ARQ/ARQ, apesar deste representar 27,7% dos genótipos dos animais saudáveis, diferença esta significativa estatisticamente ($p < 0,05$). Porém, quando o alelo ARQ está associado ao alelo ARR, este genótipo representa 77,8% dos casos positivos para a presença do PrP^{Sc} e 38,5% dos casos de animais saudáveis ($p < 0,02$).

O alelo VRQ, quando associado ao ARQ, não apresentou nenhum resultado positivo, mas estava presente em 6,2% dos animais sem scrapie. Porém associado ao ARR estava em 11,1% das amostras positivas e em somente 1,5% das negativas. Novamente, a presença do alelo ARR em conjunto com o alelo VRQ, assim como se observou quando o ARR estava associado ao alelo ARQ, aumentou a porcentagem de resultados positivos. Mesmo sem diferença estatística significativa, estes resultados indicam uma possível tendência de inversão na influência dos alelos, que deve ser estudada mais profundamente.

O fato destes animais serem originários de cruzamentos de várias raças pode ter contribuído para resultados inesperados. Autores trabalhando com a raça Texel encontraram o alelo ARQ como codominante com o alelo VRQ, não conferindo proteção (BELT *et al.*, 1995), o que está em contradição a dados da raça Ile de

France (LAPLANCHE *et al.*, 1993). BAYLIS *et al.* (2002) estudando um rebanho de 230 ovinos Texel, relatam que 47,6% dos casos positivos eram do genótipo VRQ/ARQ, 28,6% VRQ/ARH, 14,3% ARQ/ARQ e somente 9,5% VRQ/ARR.

A presença de cepas diferentes de scrapie não pode ser descartada. MOUM *et al.* (2005) encontraram uma forte associação entre a presença dos casos atípicos e os alelos AF₁₄₁RQ e AHQ. Pelo menos um desses alelos, ou ambos, estavam presentes em 36 dos 38 casos analisados. Os outros dois casos eram ARQ/ARQ. Em contrapartida, nenhum animal possuindo alelo VRQ foi identificado com scrapie atípico, ainda que presente na população estudada com uma frequência alélica de 12,5%, sugerindo que este alelo confere resistência ao scrapie Nor98, enquanto é altamente susceptível aos casos clássicos. Baseado nestas distribuições contrastantes dos genótipos PrP entre os casos de Nor98 e os casos clássicos, é possível conceber que a persistência de vários polimorfismos no gene PrP ovino pode ser em parte devido aos opostos regimes seletivos impostos por dois (ou mais) tipos de scrapie.

O Setor de Ovinocultura da PUCPR ficou sem ovinos desde o abate dos animais contaminados em abril de 2006 até agosto quando, com autorização do MAPA, foram introduzidas no setor 10 ovelhas mestiças da raça Texel. As pesquisas mais recentes demonstram que uma vez o ambiente contaminado, existe uma forte interação do prion PrP^{Sc} com o solo e minerais, permanecendo por pelo menos mais de 3 anos infectivo (LEITA *et al.*, 2006; JOHNSON *et al.*, 2006).

GEORGSSON *et al.* (2006) citam o caso da Islândia que, em 1978, após o sacrifício de todos os rebanhos acometidos por scrapie, desinfecção das propriedades e reintrodução, após 2 a 3 anos de cordeiros de áreas livres, a doença reapareceu em 33 fazendas, sendo que em 9 dessas, os casos surgiram 14 a 21 anos após o abate. Ainda que não se possa descartar totalmente a entrada do agente, aparentemente o reaparecimento da doença foi devido à contaminação ambiental. Em um caso específico, a investigação epidemiológica leva a concluir que o agente permaneceu viável por 16 anos.

A observação, em longo prazo, destes animais novos do Setor de Ovinocultura irá permitir verificar se a contaminação permanece e, caso os animais venham a ser genotipados, a relação dos genótipos com a presença ou não do PrP^{Sc}.

Enquanto a Europa trabalha consistentemente nos programas de seleção genéticas dos alelos resistentes, há pesquisadores que levantam questões sobre os problemas destes programas de cruzamentos seletivos.

A maioria dos dados disponíveis relacionados com susceptibilidade está baseada na genotipagem dos códons 136, 154 e 171, sem levar em conta o efeito de outras mutações. Recentemente, foi encontrado uma forte correlação entre a mutação no códon F₁₄₁ e a cepa Nor98 (MOUM *et al.*, 2005) indicando que a visão atual considerando o polimorfismo PrP e a susceptibilidade ao scrapie, se considerada a biodiversidade global, podem estar “viciada” (EFSA, 2006).

ROUGHSEGE *et al.* (2006) destacam três riscos primários de programas seletivos de cruzamentos. O primeiro deles seria o aparecimento de uma nova EET, mais ameaçadora que o scrapie, e cujos alelos favorecidos pelos programas atuais não fossem resistente. Por outro lado, algum destes alelos que estaria sendo selecionado negativamente poderia ser resistente. O segundo risco seria a perda de características favoráveis como, por exemplo, as produtivas. Isto aconteceria se o locus PrP tiver efeitos pleiotrópicos em características de performance, saúde ou adaptação, ou ainda, se estiver em ligação de desequilíbrio com loci que controlam estas características. O terceiro risco seria o aumento da consangüinidade, principalmente em raças com baixa freqüência do genótipo ARR/ARR, que acabariam utilizando um número reduzido de reprodutores. BISHOP (2006) cita que este problema seria mais grave em raças menos numerosas.

Seria correto considerar que ovinos codificando alelos ARR estão menos sujeitos ao risco de serem infectados por agentes do scrapie clássico e EEB experimental. Entretanto, erradicar permanentemente e irreversivelmente a variabilidade do gene PrP poderia resultar em graves problemas no futuro, encarando agentes de EETs ainda desconhecidos que possam ocorrer. Preocupados com estes questionamentos, uma recente avaliação de risco biológico (EFSA, 2006) feita por pesquisadores europeus tenta analisar estes itens, principalmente considerando o atual programa de cruzamentos proposto pela decisão 2003/100/EC da UE (EU, 2003).

Segundo esta avaliação (EFSA, 2006), até agora, não há evidência científica que a ocorrência de EETs atípicas esteja ligada à implementação de seleção do PrP (seleção de animais ARR). Os casos Nor98 (que podem ser considerados como

formas de casos atípicos) foram identificados antes da implantação dos programas. Isto sugere que casos atípicos já estavam presentes na população de ovinos da Europa, mas não eram identificados devido a suas características peculiares.

Há ainda pesquisadores que, em avaliações epidemiológicas, consideram que os casos únicos de scrapie atípico nos rebanhos, sem prévio contato, poderiam ser espontâneos, como acontece na DCJ esporádica em humanos (BENESTAD et al., 2003; NÖREMARK, 2006).

Os agentes das EETs na sua biodiversidade, claramente têm melhores habilidades em se desenvolver em alguns genótipos que em outros. Isto é exatamente o princípio dos programas de cruzamentos seletivos. Porém, o risco de observar-se um novo tipo de EET em genótipos previamente considerados como pouco susceptível não pode ser descartado (EFSA, 2006).

Quanto à possibilidade de efeitos de interferência em características produtivas, de saúde ou performance, os dados disponíveis, até o momento, são oriundos de experimentos com alguns dos genótipos sem representação, ou com pouca representatividade, invalidando os resultados. As avaliações devem ser baseadas na comparação direta entre os diferentes genótipos para qualquer característica de interesse. É essencial quando se avaliam estes efeitos que se tenha a certeza de não há confusão entre possível efeito da PrP e efeito de famílias ou linhagens. A tendência geral é uma ausência de efeitos diretos do gene PrP nas características mensuradas (BONNET et al., 2004; MOUM et al., 2005; VITEZICA et al., 2006).

Alternativamente, qualquer efeito evidente (em características de produção ou sanidade) de marcadores genéticos localizados próximos ao locus PrP é um indicador de possível co-seleção do alelo ARR com características favoráveis ou desfavoráveis. Isto introduz a necessidade um monitoramento desta co-seleção nos planos de cruzamento. Na literatura, já está disponível uma série de experimentos detectando *Quantitative Trait Loci* (QTL) para muitas características de produção e sanidade em várias raças ou animais cruzados. Os dados relativos a QTL de bovinos, considerando que o cromossomo 13 (onde está o locus do PrP) de ovinos e bovinos é homólogo entre os dois genomas, também eventualmente podem ser utilizados (EFSA, 2006). Já está identificado, por exemplo, um QTL localizado

próximo ao ILST059 (microsatélite distante 16cM da PrP) que controla a variabilidade da resistência à infecção por nematódeos (RUPP *et al.*, 2003).

Quanto à possibilidade de consangüinidade, a conclusão da EFSA (2006) é que não há evidências científicas suficientes de perda de variabilidade genética em características de importância econômica, mas há uma perda de variabilidade genética na região próxima ao gene da PrP no cromossomo 13.

E a situação brasileira dentro do contexto do scrapie? Segundo a OIE, os dados oficiais de notificações de scrapie no Brasil, após o relato em 1985, foram 4 casos “isolados” nos anos de 2000, 2001, 2003 e 2005 (dados disponíveis no endereço <http://www.oie.int/hs2>). Destes, somente o caso de 2005 não ocorreu no Paraná, porém era em animal da raça Suffolk comprado de rebanho paranaense. O caso do rebanho da PUC é o de 2003 e foi considerado o primeiro caso autóctone do Brasil.

Segundo o Instituto Brasileiro Geografia e Estatística (IBGE, 2005), o rebanho de ovinos brasileiro em 2005 era de 15.588.041 cabeças e o rebanho paranaense de 511.801 cabeças. O Paraná sempre teve uma pequena participação, em torno de 3 a 5%, do total do rebanho brasileiro. Ainda que pequeno em número, o rebanho de animais puros, principalmente da raça Suffolk, foi o principal fornecedor de genética para muitos Estados Brasileiros (São Paulo, Mato Grosso, Estados do Nordeste), em especial na década de 80 e início da década de 90, quando reprodutores e matrizes do Paraná eram levados para feiras e exposições agropecuárias e todos estes animais eram vendidos. Nesta época, muitos criadores paranaenses organizavam consórcios e importavam sêmen e animais vivos dos EUA. Vale lembrar que nos Estados Unidos o scrapie é uma doença endêmica (DETWILER e BAYLIS, 2003).

Importando animais de um país onde scrapie é endêmico, principalmente na raça Suffolk (WESTAWAY *et al.*, 1994) e sem nenhuma forma de diagnóstico *in vivo* até então, é lógico se suspeitar que animais infectados e no período de incubação da doença, tenham sido trazidos para o Brasil. Em rebanhos puros de ovinos Suffolk era comum o aparecimento de animais com sinais clínicos compatíveis com scrapie, porém, sem diagnóstico e sem notificação. Os criadores, alertados pelos vendedores dos animais nos EUA, e temerosos das consequências que poderia haver caso as suspeitas fossem notificadas às autoridades competentes aqui no Brasil (prejuízo econômico e perda do material genético, pelo abate de todos os animais),

começaram a ocultar os casos com clínica compatível. Este procedimento também ocorre em países onde a doença é conhecida há décadas e amplamente discutida. Estima-se que somente 13% a 38% dos criadores relatem os casos de scrapie (HOINVILLE *et al.*, 2000, SIVAM *et al.*, 2004). Supõe-se, portanto, que muitas das cabanhas de Suffolk e Hampshire Down no Paraná, com animais de origem importada, tenham tido casos de animais suspeitos de scrapie. O não relato dos casos impedia a confirmação do diagnóstico e pode ter provocado uma disseminação do agente causador pelas propriedades paranaenses. O quanto outras raças e mesmo os animais mestiços podem estar contaminados é difícil de avaliar. Porém, o longo período de incubação da doença, mas já com eliminação do agente via placenta e fluidos fetais infectantes (ANDRÉOLETTI *et al.*, 2002; TOUZEAU *et al.*, 2006), além da persistência deste agente no ambiente (LEITA *et al.*, 2006; JOHNSON *et al.*, 2006; GEORGSSON *et al.*, 2006), são motivos suficientes para se fazer estes questionamentos. Os resultados deste trabalho mostram animais positivos para o scrapie da raça Hampshire Down e mestiços, além de mostrar que em todas as raças criadas no Paraná, existem genótipos considerados susceptíveis à doença pela literatura mundial. Há, inclusive, a presença dos alelos ARQ e AHQ, considerados susceptíveis ao scrapie atípico.

DETWILER e BAYLIS (2003) afirmam que a experiência mostra que a prevenção deve ser prioritária em países, regiões ou rebanhos onde o scrapie não está presente. A rápida eliminação da doença, imediatamente após a introdução é uma estratégia essencial se as medidas preventivas não foram eficientes. Falhas na prevenção ou eliminação permitem uma disseminação silenciosa da doença durante seu longo período de incubação (meses ou anos). Para aqueles países ou regiões nos quais a doença se tornou endêmica, esforços para eliminar a doença têm atravessado décadas e, na maioria dos casos, não têm tido sucesso.

O Brasil não conseguiu impedir a entrada da doença no País, nem tampouco foi eficiente em eliminá-la em curto tempo. Os resultados mostrados neste trabalho preocupam pela presença de animais positivos pela IHQ e sem nenhum sinal clínico, no rebanho contaminado. Como se estima que muitos dos casos no Brasil não são notificados, a doença pode estar sendo disseminada de forma silenciosa, especialmente pelo intenso comércio de animais, inclusive de matrizes, que ocorre no país atualmente.

Uma das raças que mais cresce em termos de número no Brasil é a raça Santa Inês e vem sendo desenvolvido um grande trabalho de melhoramento desta raça e de outras raças deslanadas nativas, que podem vir a se tornar um produto de exportação brasileira. A presença do scrapie no Brasil e o perfil de genótipos susceptíveis nestas raças poderia ser uma dificuldade para a exportação destes animais. Além disso, assim como na bovinocultura, o Brasil tem um enorme potencial para a produção de carne de pequenos ruminantes para exportação. Num mundo globalizado, observa-se o aumento de barreiras sanitárias, em substituição às alfandegárias. Portanto, programas de controle e vigilância de doenças devem ser conduzidos com muito cuidado e responsabilidade, a fim que garantir a aceitação dos produtos brasileiros sem quaisquer restrições.

O grupo de trabalho, vinculado ao Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros e Controle das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis, que está elaborando um programa de controle de scrapie, ainda não disponível para a avaliação da comunidade, deve levar em consideração alguns fatores, discutidos a seguir.

O primeiro passo a ser dado, antes de qualquer outro, é se conhecer a real situação da doença no Brasil. Ainda que no Paraná houve épocas em que nos rebanhos elite de animais puros era comum e freqüente a presença de animais clinicamente suspeitos, em outras regiões não se tem noção da incidência. Certamente os casos relatados não demonstram a situação real. O fato de não relatar os casos pode ter acontecido e continuar acontecendo. Da mesma forma, o aparecimento tardio dos sinais clínicos pode fazer com que parte dos animais contaminados sejam abatidos ou morram por outras causas antes do aparecimento da doença clinicamente.

O segundo passo é alertar a comunidade científica, técnica e ovinocultores. O desconhecimento total da doença, por parte da maioria dos criadores e mesmo técnicos, pode levar ao não reconhecimento da doença ou que ela possa ser confundida com tantas outras enfermidades que apresentam sinais clínicos semelhantes.

Portanto, a única maneira de se conhecer a real incidência é começando um programa de vigilância ativa, investigando as suspeitas clínicas e procurando casos positivos em animais que são abatidos e estão supostamente saudáveis. Animais

que morrem na propriedade também devem ser examinados. A legislação em vigor (BRASIL, 2003a,b), prevê a vigilância epidemiológica para detecção de EETs em ruminantes destinados ao abate de emergência e somente com colheita de tronco encefálico. Os dados dos animais da PUCPR mostram que animais positivos podem estar presentes no rebanho sem apresentar qualquer manifestação clínica e com acúmulo de PrP^{Sc} somente em tecidos linfóides.

Concomitante à vigilância ativa, deveria ser incentivada a genotipagem dos animais por parte dos criadores de raça pura. Assim, seria possível começar a formar um banco de dados sobre as diferentes raças. Uma maneira de se conseguir que os animais puros, de elite genética, fossem genotipados, seria a exigência deste exame para machos em exposições agropecuárias, ou pelo menos para aqueles que fossem ser comercializados durante o evento. Nesta fase não se restringiria nenhum genótipo, apenas se exigiria o exame. A conscientização dos criadores sobre a importância de se conhecer o genótipo de seus animais, também facilitaria a formação deste banco de dados, pela genotipagem voluntária dos rebanhos de ovinos puros.

Já na vigilância, quando fossem encontrados casos positivos, estes deveriam ser genotipados e voltar-se-ia ao rebanho, genotipando também todos os animais. Desta forma, assim como foi feito no rebanho da PUC, seria possível iniciar um estudo de associação genótipo-doença. Com esses dados, e que são essenciais para se propor qualquer tipo de controle, mais os dados acumulados sobre os genótipos nas principais raças brasileiras, poder-se-ia começar a pensar num programa de controle baseado em cruzamentos seletivos.

Antes disso, haveria dois riscos: primeiro de que os genótipos considerados resistentes ou susceptíveis, pela maioria dos artigos de literatura, não tenham a mesma associação nos rebanhos brasileiros, quer por diferenças entre as raças, cruzamentos, ou mesmo cepas de scrapie. O outro risco seria se impor programas de seleção de alguns genótipos como ARR/ARR, e haver raças que não apresentam este genótipo, ou que a frequência é muito baixa. Neste levantamento, ainda que limitado pelo número de animais genotipados de cada raça, já foi possível observar que algumas delas, como a Dorper, teriam grandes dificuldades em prover reprodutores destes genótipos.

Estas dificuldades ficam mais nítidas quando se realiza uma simulação da classificação pelos critérios do *National Scrapie Plan* dos animais genotipados neste trabalho. Menos da metade dos animais (43,9%) estariam classificados nos tipos 1 e 2, onde não é feita nenhuma restrição para os machos, ainda que se incentive o tipo 1 (ARR/ARR). Quando se avaliam as raças individualmente, observam-se resultados bastante distintos, com raças que não chegam a atingir 15% dos animais nestes dois grupos, como o caso da raça Dorper, e raças como a Ile de France, onde 91,6% dos animais estariam classificados nos grupos 1 e 2.

O grupo 3, com a maioria dos genótipos aí classificados, 47,8%, e praticamente todas as raças tendo neste grupo o maior número de representantes (exceto a raça Crioula e os mestiços) é o mais controverso de todos. Já houve restrições à comercialização de carneiros deste grupo, que já não são mais aplicadas, mas ainda há restrições dependendo da raça e do tipo de criação (DEFRA, 2003). Parte destas mudanças se deve ao aparecimento de novas cepas de scrapie, com perfis de susceptibilidade diferentes e, portanto, que levaram a uma revisão das restrições a alguns genótipos, tentando preservar uma maior variabilidade (BISHOP, 2006).

Os genótipos do tipo 4 do NSP são um problema em particular. Apesar destes animais terem um risco pequeno de desenvolverem scrapie durante suas vidas, eles têm potencial para gerar uma progênie do tipo 5, que possui grandes risco de se contaminar, se expostos ao agente do scrapie. Desta forma, as restrições a carneiros neste grupo, assim como no grupo 5 são severas, devendo os animais serem abatidos ou castrados num período máximo de 90 dias após o resultado da genotipagem. Dentre os animais genotipados neste trabalho, 8,3% estariam classificados nestes dois grupos. Porém, raças como o Dorper e a Santa Inês, apresentam, respectivamente, 25,9% e 17,9% dos animais nestes grupos e são raças que têm apresentado um grande interesse por parte dos criadores.

MUTINELLI *et al.* (2003) relatam o caso de um rebanho italiano de ovelhas leiteiras onde foi encontrado um animal positivo para scrapie, de genótipo ARQ/AHQ. Foi proposto que somente machos ARR/ARR e fêmeas que carregassem pelo menos um alelo ARR permanecessem. Animais com genótipo ARR/VRQ também seriam sacrificados. De 52 carneiros e 463 ovelhas, somente 4 carneiros eram ARR/ARR e 33,9% das ovelhas eram de genótipos susceptíveis, indicando que

a disponibilidade de carneiros “totalmente resistentes” seria um fator limitante no desenlace de surtos de scrapie usando o critério genético.

Portanto, no caso de se propor estratégias de controle baseadas na relação entre o polimorfismo do gene PrP e a resistência/susceptibilidade ao scrapie, antes de qualquer coisa, deve-se saber a estrutura populacional e o grau de variabilidade existente nas diferentes raças, genotipando a população, ou parte representativa dela. Somente a partir daí é possível decidir quais os genótipos serão restritos à reprodução. MOLINA *et al.* (2006) estudaram 5 estratégias para a erradicação do scrapie na Espanha na raça Merino. Porém, antes foi necessário genotipar 3193 carneiros, a fim de se ter uma noção da frequência dos diferentes alelos e genótipos presente nos rebanhos e se poder realizar uma simulação das diferentes estratégias e o impacto de cada uma delas. Para este caso especificamente, a estratégia com melhores resultados foi a de genotipar somente os carneiros e eliminar animais ARQ/ARQ e portadores de alelos VRQ, conseguindo-se aumentar a resistência e causando o mínimo de custo e perda de animais.

Já WINDIG *et al.* (2004) propõem regras mais práticas para uma seleção: seleção branda, utilizando indiscriminadamente carneiros com um alelo ARR; moderada, dando preferência para carneiros ARR/ARR; e severa, utilizando somente carneiros ARR/ARR. A escolha entre os três níveis de seleção dependeria do tamanho da população e da frequência do alelo ARR.

Obter-se a relação genótipo-resistência/susceptibilidade, é essencial para se começar qualquer programa de controle. Somente desta forma poder-se-á estar seguro de que, para determinada raça ou grupo étnico, aquele genótipo é resistente ou susceptível.

Os resultados deste trabalho mostram que existem diferenças importantes quando comparados aos resultados de outros países, indicando a necessidade de se ampliar o número de animais genotipados antes que qualquer programa de controle do scrapie seja implantado no Brasil. Faz-se fundamental também estudar a relação genótipo e resistência/susceptibilidade das raças estrangeiras criadas no Brasil, das raças brasileiras e dos animais mestiços.

6 CONCLUSÕES

Foi possível genotipar 325 ovinos das raças Suffolk, Hampshire Down, Ile de France, Dorper, Dorset, Texel, Santa Inês, Crioula e animais mestiços.

Dos 15 genótipos do gene PrP normalmente encontrados em ovinos, 7 estão presentes nas amostras examinadas: ARR/ARR; ARR/ARQ; ARR/VRQ; ARR/AHQ; ARQ/ARQ; ARQ/VRQ; ARQ/AHQ.

As freqüências alélicas e genótípicas variaram entre as diferentes raças. O alelo mais freqüente foi o ARQ. Não foi encontrado o alelo ARH. A raça Santa Inês e os animais mestiços foram os que apresentaram a maior variabilidade no gene PrP, com seis genótipos distintos, e as raças Suffolk e Ile de France foram as que apresentaram a menor variabilidade. Os genótipos ARQ/ARQ e ARR/ARQ foram os mais freqüentes e encontrados em todas as raças.

No rebanho contaminado pelo prion, houve resultados positivos para a presença do PrP^{Sc} em todos os genótipos presentes no rebanho, exceto no genótipo ARR/ARR. No grupo de animais puros Hampshire Down não houve influência dos genótipos no resultado da IHQ. A presença do alelo ARR foi maior nos animais sem scrapie, porém não foi possível estatisticamente correlacioná-lo à resistência à doença.

No grupo de animais mestiços houve influência estaticamente significativa entre os genótipos e o aparecimento do prion ($p < 0,02$). A diferença no número de animais com tecidos positivos na IHQ foi estatisticamente significativa para o genótipo ARQ/ARQ ($p < 0,05$), sendo encontrado somente em animais sem a doença. Para o genótipo ARR/ARQ também houve diferença significativa ($p < 0,02$), sendo que este genótipo representou 77,8% dos animais mestiços contaminados. O alelo ARR estava presente em maior porcentagem no rebanho positivo, porém não foi possível estatisticamente correlacioná-lo ao aparecimento da doença.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho pode contribuir para futuros estudos e programas de controle do scrapie. Enquanto a legislação atual trabalha com vigilância somente de animais suspeitos, ficou aqui demonstrado que animais clinicamente saudáveis podem estar contaminados (12,7% do rebanho saudável com amostras positivas na IHQ) e, portanto, também devem ser avaliados. Da mesma forma, os órgãos e tecidos colhidos para análise não podem ser restritos ao sistema nervoso, devendo incluir tecidos linfóides (das amostras positivas para IHQ, 86,67% eram em tecidos linfóides).

Foi observada a presença de genótipos considerados susceptíveis ao scrapie em oito raças criadas e avaliadas no Paraná, assim como a presença dos alelos ARQ e AHQ, susceptíveis ao scrapie atípico (nor98). As variações nas frequências alélicas e genotípicas indicam que o estudo sobre o polimorfismo nestas e em outras raças deve ser ampliado, a fim de permitir, no futuro, um possível programa de cruzamentos seletivos.

Finalmente, neste trabalho foi possível diagnosticar scrapie em animais de diferentes graus de mestiçagem e da raça Hampshire Down. Confirmada a presença do prion, torna-se possível associar o polimorfismo do gene PrP à resistência ou susceptibilidade ao scrapie. No grupo dos mestiços o genótipo ARQ/ARQ estava associado à resistência e o ARR/ARQ à susceptibilidade, em contraste com alguns dados de literatura. Estudos como este devem ser feitos para identificar os genótipos resistentes e susceptíveis nas diferentes raças, contribuindo para agregar valor aos reprodutores e matrizes, que poderão ser comercializados com a certificação de serem resistentes ao scrapie, além de auxiliarem no controle da doença.

8 REFERÊNCIAS

- ACÍN, C.; MARTÍN-BURRIEL, I.; GOLDMANN, W.; LYAHYAI, J.; MONZÓN, M.; BOLEA, R.; SMITH, A.; RODELLAR, C.; BADIOLA, J.J.; ZARAGOZA, P. Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 2103-2110, 2004.
- ANDRÉOLETTI, O.; BERTHON, P.; MARC, D.; SARRADIN, P.; GROSCLAUDE, J.; KEULEN, L. van; SCHELCHER, F.; ELSESEN, J.M.; LANTIER, F. Early accumulation of PrP^{Sc} in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 3115-3126, 2000.
- ANDRÉOLETTI, O.; LACROUX, C.; CHABERT, A.; MONNREAU, L.; TABOURET, G.; LANTIER, F.; BERTHON, P.; EYCHENNE, F.; BENESTAD, S.L.; ELSESEN, J.M.; SCHELCHER, F. PrP^{Sc} accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 2607-2616, 2002.
- ANDRÉOLETTI, O.; MOREL, N.; LACROUX, C.; ROUILLON, V.; BARC, C.; TABOURET, G.; SARRADIN, P.; BERTHON, P.; BERNARDET, P.; MATHEY, J.; LUGAN, S.; COSTES, P.; CORBIERE, F.; ESPINOSA, J.C.; TORRES, J.M.; GRASSI, J.; SCHELCHER, F.; LANTIER, F. Bovine spongiform encephalopathy agent in spleen from an ARR/ARR orally exposed sheep. **Journal of General Virology**, v. 87, v. 4, p. 1043-1046, 2006a.
- ANDRÉOLETTI, O.; TABOURET, G.; LACROUX, C.; FOUCRAS, G.; CHABERT, A.; LUGAN, S.; ROUILLON, V.; EYCHENNE, F.; ELSESEN, J.M.; SCHELCHER, F. The pathogenesis of scrapie in small ruminants. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. **Abstracts...** London: Veterinary Laboratory Agency, 2006b, p. 41.
- ANVISA. **Encefalopatia espongiforme transmissível: caderno técnico**. 1ªed. – Brasília, 2004, 188p.

APHIS. **Animal disease eradication programs and control and certification programs.**, 2005 Disponível em:

<http://www.aphis.usda.gov/publications/animal_health/content/printable_version/AHR_Web_PDF/E_chapter_3.pdf> Acesso em 08 jan. 2006.

BASLER, K.; OESAH, B.; SCOTT, M.; WESTAWAY, D.; WALCHLI, M.; GROTH, D.F.; McKINLEY, M.P.; PRUSINER, S.B.; WEISSMANN, C. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. **Cell**, v. 46, n. 3, p. 417-28, 1986.

BAYLIS, M. The epidemiology of scrapie and options for control. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. **Abstracts...** London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 34.

BAYLIS, M.; GOLDMANN, W.; HOUSTON, F.; CAIRNS, D.; CHONG, A.; ROSS, A.; SMITH, A.; HUNTER, N.; McLEAN, A.R. Scrapie epidemic in a fully PrP-genotyped sheep flock. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 2907-2914, 2002.

BAYLIS, M.; CHIHOTA, C.; STEVENSON, E.; GOLDMANN, W.; SMITH, A.; SIVAM, K.; TONGUE, S.; GRAVENOR, M.B. Risk of scrapie in British sheep of different prion protein genotype. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 2735-2740, 2004.

BELLWORTHY, S. J.; HAWKINS, S.A.; GREEN, R.B.; BLAMIRE, I.; DEXTER, G., DEXTER, I.; LOCKEY, R.; JEFFREY, M.; RYDER, S.; BERTHELIN-BAKER, C.; SIMMONS, M.M. Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy infectivity in Romney sheep up to the onset of clinical disease after oral challenge. **Veterinary Record**, v. 156, v. 7, p. 197-202, 2005.

BELT, P.B.G.M.; MUILEMAN, I.H. SCHREUDER, B.E.C.; BOS-DE-RUIJTER, J. GIELKENS, A.L.J., SMITS, M.A. Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 509-517, 1995.

BENESTAD, S.L.; SARRADIN, P.; THU, B.; SCHÖNHEIT, J.; TRANULIS, M.A.; BRATBERG, B. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. **Veterinary Record**, v. 153, p. 202-208, 2003.

BENESTAD, S.L.; ANDRÉOLETTI, O.; LAUDE, H.; GRASSI, J.; BILHEUDE, J.M.; SARRADIN, P.; MOUM, T.; MOLDAL, T.; BRATBERG, B. Atypical scrapie in Norway. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. **Abstracts**... London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 55.

BILLINIS, C.; PSYCHAS, V.; LEONTIDES, L.; SPYROU, V.; ARGYROUDIS, S.; VLEMMAS, I.; LEONTIDES, S.; SKLAVIADIS, T.; PAPADOPOULOS, O. Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected sheep in Greece. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 547-554, 2004.

BISHOP, S. The potential adverse consequences of breeding for resistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. **Abstracts**... London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 28.

BOLTON, D.C.; McKINLEY, M.P.; PRUSINER, S.B. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. **Science**, v. 218, p. 1309-1311, 1982.

BONNET, E., ELSEN, J.M., VITEZICA, Z.G., BODIN, L. Estudio de asociacion entre el gen PrP y la fertilidad de machos de la raza Lacaune. In **Proceedings of the XII Reunión Nacional de Mejora Genética Animal**, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Espanha, 2004.

BOSSERS, A.; SCHREUDER, B.E.; MUILEMAN, I.H.; BELT, P.B.; SMITS, M.A. PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. **Journal of General Virology**, v. 77, v. 10, p. 2669-2673, 1996.

BOSSERS, A.; HARDERS, F.L.; SMITS, M.A. PrP genotype frequencies of the most dominant sheep breed in a country free from scrapie. **Archives of Virology**, v. 144, p. 829-834, 1999.

BRASIL. Portaria n. 365, de 03 de julho de 1996. Proíbe em todo o território nacional o uso na alimentação de ruminantes (bovinos, ovinos e caprinos) de proteína "in natura" e de farinhas de carne e de ossos provenientes de ruminantes. **Diário Oficial da União**, 04 jul., seção 1, 1996.

BRASIL. Portaria n. 516, de 09 de dezembro de 1997. Declara o Brasil livre de encefalopatia espongiforme bovina, de acordo com o que estabelece o artigo 3.2.13.2 do Código Zoossanitário Internacional. **Diário Oficial da União**, 11 dez., seção 1, p. 29476, 1997.

BRASIL. Instrução de serviço n. 2, de 12 de agosto de 2003. Dispõe sobre procedimentos e normas necessários para operacionalização do sistema de vigilância epidemiológica para detecção de Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis – EET – em ruminantes. 2003a.

BRASIL. Instrução de serviço n. 2, de 15 de agosto de 2003. Determinar que todos os matadouros-frigoríficos, matadouros e matadouros de pequenos e médios animais, com serviço de inspeção federal - SIF, que abatem bovídeos e/ou ovinos/caprinos, participem da vigilância para as encefalopatias espongiformes transmissíveis - EET nos animais dessas espécies destinados ao abate de emergência. 2003b.

BRASIL. Instrução normativa n. 18, de 27 de fevereiro de 2004. Estabelece as normas sobre os requisitos de qualidade para efeito de credenciamento e monitoramento de laboratório pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com vistas a procederem a diagnósticos das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET) em ruminantes pela técnica de imunohistoquímica (IHQ). **Diário Oficial da União**, 23 mar., seção 1, p. 3, 2004.

BRICARELLO, P.A.; AMARANTE, A.F.T.; ROCHA, R.A.; CABRAL FILHO, S.L.; HUNTLEY, J.F.; HOUDIJK, J.G.M.; ABDALLA, A.L.; GENNARI, S.M. Influence of dietary protein supply on resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Inês lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 134, p. 99-109, 2005.

BUSCHMANN, A.; BIACABE, A.G.; ZIEGLER, U.; BENCSIK, A.; MADEC, J.Y.; ERHARDT, G.; LUHKEN, G.; BARON, T.; GROSCHUP, M.H. Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. **Journal of Virological Methods**, v. 117, v. 1, p. 27-36, 2004a.

BUSCHMANN, A.; LUHKEN, G.; SCHULTZ, J. ERHARDT, G.; GROSCHUP, M.H. Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrP ARR/ARR). **Journal of General Virology**, v. 85, v. 9, p. 2727-2733, 2004b.

CASTILLA, J.; SAÁ, P.; SOTO, C. Detection of prions in blood. **Nature Medicine**. v.11, n. 9, p. 982-985, 2005.

CAUGHEY, B.W.; DONG, A.; BHAT, K.S.; ERNST, D.; HAYES, S.F.; CAUGHEY, W.S. Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. **Biochemistry**, v.30, v. 43, p. 7672-7680, 1991.

CLOUSCARD, C.; BEAUDRY, P.; ELSER, J.M.; MILAN, D.; DUSSAUCY, M.; BOUNNEAU, C.; SCHELCHER, F.; CHATELAIN, J.; LAUNAY, J.M.; LAPLANCHE, J.L. Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie. **Journal of General Virology**, v. 76, v. 8, p. 2097-2101, 1995.

COCKCROFT, P.D.; CLARK, A.M. The Shetland Islands scrapie monitoring and control programme: analysis of the clinical data collected from 772 scrapie suspects 1985-1997. **Research in Veterinary Science**, v. 80, p. 33-44, 2006.

DAWSON, M.; HOINVILLE, L.J.; HOSIE, B.D.; HUNTER, N. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. **Veterinary Record**, v. 142, p. 623-625, 1998.

DAWSON, M. Approaches for breeding for resistance – the GB experience. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. **Abstracts**...London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 27.

DeARMOND, S.J.; PRUSINER, S.B. The neurochemistry of prion diseases. **Journal of Neurochemistry**, v. 61, n. 5, p. 1589-601, 1993.

DeBOSSCHERE, H.; ROELS, S.; BENESTAD, S.L.; VANOPDENBOSCH, E. Scrapie case similar to Nor98 diagnosed in Belgium via active surveillance. **Veterinary Record**, v. 155, n. 22, p. 707-708, 2004.

DEFRA **National Scrapie Plan for Great Britain**. Department for Food, Environment and Rural Affairs, 2003. Disponível em:

<<http://www.defra.gov.uk/corporate/regulat/forms/Ahealth/nsp/nsp1.pdf>> Acesso em 10 dez. 2005.

DeSILVA, U.; GUO, X.; KUPFER, D.M.; FERNANDO, S.C.; PILLAI, A.T.V.; NAJAR, F.Z.; SO, S.; FITCH, G.Q.; ROE, B.A. Allelic variants of ovine prion protein gene (PRNP) in Oklahoma sheep. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 102, p. 89-94, 2003.

DETWILER, L.A.; BAYLIS, M. The epidemiology of scrapie. **Revue scientifique et technique. Office International des Epizooties**, v. 22, n. 1, p. 121-143, 2003.

DICKINSON, A.G. Scrapie in sheep and goats. In: Kinberlin, R.H. (ed), **Slow virus diseases of animals and man**. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, Oxford, p. 209-241, 1976.

DRIEMEIER, D. Scrapie. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.; MÉNDEZ, M.C.; LEMOS, R.A. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. São Paulo: Livraria Varela, 2001, vol. 1, p. 391-396.

EFSA. Scientific Report of the European Food Safety Authority on the Assessment of the Geographical BSE-Risk (GBR) of Brazil. **EFSA Scientific Report**, v.38, p. 1-5, 2005.

EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on “the breeding programme for TSE resistance in sheep” **The EFSA Journal**, v. 382, p. 1-46, 2006.

EGLIN, R.D.; WARNER, R.; GUBBINS, S.; SIVAM, S.K.; DAWSON, M. Frequencies of PrP genotypes in 38 breeds of sheep sampled in the National Scrapie Plan for Great Britain. **Veterinary Record**, v. 156, p. 433-437, 2005.

EHLING, C.; RATH, D.; STRUCKMANN, C.; FRENZEL, A.; SCHINDLER, L.; NIEMANN, H. Utilization of frozen–thawed epididymal ram semen to preserve genetic diversity in Scrapie susceptible sheep breeds. **Theriogenology**, v. 66, n. 9, p. 2160-2164, 2006.

ELOIT, M.; ADJOU, K.; CUOLPIER, M.; FONTAINE, J.J.; HAMEL, R.; LILIN, T.; MESSIAEN, S.; ANDREOLETTI, O.; BARON, T.; BENCSIK, A.; BIACABE, A.G.; BERINGUE, V.; LAUDE, H.; LE DUR, A.; VILOTTE, J.L.; COMOY, E.; DESLYS, J.P.; GRASSI, J.; SIMON, S.; LANTIER, F.; SARRADIN, P. BSE agent signatures in a goat. **Veterinary Record**, v. 156, p. 523-524, 2005.

ELSEN, J.M.; AMIGUES, Y.; SCHELCHER, F.; DUCROCQ, V.; ANDREOLETTI, O. EYCHENNEM, F.; TIEN KHANG, J.V.; POIVEY, J.P.; LANTIER, F.; LAPLANCHE, J.L. Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. **Archives of Virology**, v. 144, p. 431-445, 1999.

EPSTEIN, V.; POINTING, S.; HALFACRE, S. Atypical scrapie in the Falkland Islands. **Veterinary Record**, v. 157, n. 21, p. 667-668, 2005.

ERSDAL, C.; ULVUND, M.J.; BENESTAD, S.L.; TRANULIS, M.A. Accumulation of pathogenic prion protein (PrP^{Sc}) in nervous and lymphoid tissues of sheep with subclinical scrapie. **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 164-174, 2003.

ESPENES, A.; PRESS, C.McL.; LANDSVERK, T.; TRANULIS, M.A.; ALEKSANDERSEN, M.; GUNNES, G.; BENESTAD, S.L.; FUGLESTVEIT, R.; ULVUND, M.J. Detection of PrP^{Sc} in rectal biopsy and necropsy samples from sheep with experimental scrapie. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, p. 115-125, 2006.

ESPINOSA, J.C.; DÍAZ-SAN SEGUNDO, F.; PARRA, B.; RODRÍGUEZ-BENITO, J. A.; HERVA, M. E.; RELAÑO-GINÉS, A.; BRUN, A.; CANO, M. J.; MORALES, M.; TORRES, J.M. Scrapie: susceptibilidad/resistencia a la enfermedad. **Mundo Ganadero**, v. 169, 2004.

EU. Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2001 laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. **Official Journal of the European Union**, v.147, p. 1-40, 2001.

EU. Commission Decision of 13 February 2003 laying down minimum requirements for the establishment of breeding programmes for resistance to transmissible spongiform encephalopathies in sheep. **Official Journal of the European Union**, v. 41, p. 41-45, 2003.

EUROPEAN COMMISSION **Report on the monitoring and testing of ruminants for the presence of transmissible spongiform encephalopathy (TSE) in the EU in 2005**. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 104 pp, 2006. Disponível em:
<http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/bse/annual_reps_en.htm> Acesso em 08 jan. 2006.

FERNANDES, R.E.; REAL, C.M.; FERNANDES, J.C.T. "Scrapie" em ovinos no Rio Grande do Sul. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 6, p. 139-143, 1978.

FOSTER, J.; HOPE, J.; FRASER, H. Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. **Veterinary Record**, v. 133, p. 339-341, 1993.

FOSTER, J.; BRUCE, M.E.; McCONNEL, L.; CHREE, A.; FRASER, H. Detection of BSE infectivity in brain and spleen of experimentally infected sheep. **Veterinary Record**, v. 138, p. 546-548, 1996.

FOSTER, J. D.; PARNHAM, D.; CHONG, A.; GOLDMANN, W.; HUNTER, N. Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats. **Veterinary Record**, v. 148, n. 6, p. 165-171, 2001.

FRANSCINI, N.; GEDAILY, A.E.; MATTHEY, U.; FRANITZA, S.; SY, M-S.; BÜRKLE, A.; GROSCHUP, M.; BRAUN, U.; ZAHN, R. Prion protein in milk. **PLoS ONE**, v. 1, n. 1, e71, 2006.

GAMA, L.T.; CAROLINO, M.I.; SANTOS-SILVA, M.F.; PIMENTA, J.A.; COSTA, M.S. Prion protein genetic polymorphisms and breeding strategies in Portuguese breeds of sheep. **Livestock Science**, v. 99, p. 175-184, 2006.

GAVIER-WIDEN, D.; NOREMARK, M.; BENESTAD, S.; SIMMONS, M.; RENSTROM, L.; BRATBERG, B.; ELVANDER, M.; SEGERSTAD, C.H. Recognition of the Nor98 variant of scrapie in the Swedish sheep population. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, n. 6, p. 562-567, 2004.

GEORGSSON, G.; SIGURDARSON, S.; BROWN, P. Infectious agent of sheep scrapie may persist in the environment for at least 16 years. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 3737 – 3740, 2006.

GOLDMANN, W.; HUNTER, N.; FOSTER, J.D.; SALBAUM, J.M.; BEUREYTHIER, K.; HOPE, J. Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 2476-2480, 1990.

GOLDMANN, W.; HUNTER, N.; MARTIN, T.; DAWSON, M.; HOPE, J. Different forms of the bovine PrP gene have five or six copies of a short, G-C-rich element within the protein-coding exon. **Journal of General Virology**, v. 72, n. 1, p. 201-204, 1991.

GOLDMANN, W.; HUNTER, N.; SMITH, G.; FOSTER, U.; HOPE, J. PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. **Journal of General Virology**, v. 75, n. 5, p. 989-995, 1994.

GOMBOJAV, A.; ISHIGURO, N.; HORIUCHI, M.; SERJMYADAG, D.; BYAMBAA, B.; SHINAGAWA, M. Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 65, n. 1, p. 75-81, 2003.

GONZÁLEZ, L. Preclinical diagnosis of scrapie by rectal biopsy: towards live animal surveillance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. **Abstracts**...London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 43.

GONZÁLEZ, L.; MARTIN, S.; JEFFREY, M. Distinct profiles of PrP^d immunoreactivity in the brain of scrapie- and BSE-infected sheep: implications for differential cell targeting and PrP processing. **Journal of General Virology**, v. 84, p. 1339–1350, 2003.

GONZÁLEZ, L.; JEFFREY, M.; SISÓ, S.; MARTIN, S.; BELLWORTHY, S.J.; STACK, M.J.; CHAPLIN, M.J.; DAVIS, L.; DAGLEISH, M.; REID, H. Diagnosis of preclinical scrapie in samples of rectal mucosa. **Veterinary Pathology**, v. 156, p. 846-847, 2005.

GROSCHUP, M. An overview of diagnostic tests for prion disease. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. **Abstracts**...London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 49.

GUO, X.; KUPFER, D.M.; FITCH, G.Q.; ROE, B.A.; DeSILVA, U. Identification of a novel lysine-171 allele in the ovine prion protein (PRNP) gene. **Animal Genetics**, v. 34, n. 4, p. 303-305, 2003.

HARRIS, D.A. Cellular biology of prion disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 429-444, 1999.

HEGGEBO, R.; PRESS, C. McL.; GUNNES, G.; ULVUNDT, M.J.; TRANULIS, M.A.; LANDSVERK, T. Detection of PrP^{Sc} in lymphoid tissue of lambs experimentally exposed to the scrapie agent. **Journal of Comparative Pathology**, v. 128, p. 172-181, 2003.

HILL, A. F.; ANTONIOU, M.; COLLINGE, J. Protease-resistant prion protein produced *in vitro* lacks detectable infectivity. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 11-14, 1999.

HOINVILLE, L.J.; HOEK, A.; GRAVENOR, M.B.; MCLEAN, A.R. Descriptive epidemiology of scrapie in Great Britain: results of a postal survey. **Veterinary Record**, v. 146, p. 455-461, 2000.

HOUSTON, F.; GOLDMANN, W.; CHONG, A.; JEFFREY, M.; GONZÁLEZ, L.; FOSTER, J.; PARNHAM, D.; HUNTER, N. Prion diseases: BSE in sheep bred for resistance to infection. **Nature**, v. 423, p. 498, 2003.

HUNTER, N. PrP genetics in sheep and the implications for scrapie and BSE. **Trends in Microbiology**, v. 5, n. 8, p. 331-334, 1997.

HUNTER, N.; FOSTER, J.D.; DICKINSON, A.G.; HOPE, J. Linkage of the gene for scrapie-associated fibril protein (PrP) to the Sip gene in Cheviot sheep. **Veterinary Record**, v. 124, p. 364-366, 1989.

HUNTER, N.; FOSTER, J.D.; GOLDMANN, W.; STEAR, M.J.; BOSTOCK, C. Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. **Archives of Virology**, v. 141, p. 809-824, 1996.

HUNTER, N.; GOLDMANN, W.; FOSTER, J.D.; CAIRNS, D.; SMITH, G. Natural scrapie and PrP genotype: case-control studies in British sheep. **Veterinary Record**, v. 141, p. 137-140, 1997a.

HUNTER, N.; MOORE, L.; HOSIE, B.D.; DINGWALL, W.S.; GREIG, A. Association between natural scrapie and PrP genotype in a flock of Suffolk sheep in Scotland. **Veterinary Record**, v. 140, p. 59-63, 1997b.

HUNTER, N. The role of genetics in the epidemiology and pathogenesis of scrapie. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. **Abstracts**...London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 26.

HURTADO, A.; GARCÍA-PÉREZ, A.L.; BELTRÁN de HEREDIA, I.; BARANDIKA, J.; SANZ-PARRA, A.; BERRIATUA, E.; JUSTE, R.A. Genetic susceptibility to scrapie in a population of Latxa breed in the Basque Country, Spain. **Small Ruminant Research**, v. 45, p. 255-259, 2002.

IBGE. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal, 2005.

IKEDA, T.; HORIUCHI, M.; ISHIGURO, N.; MURAMATSU, Y.; KAI-UWE, G.D.; SHINAGAWA, M. Amino acid polymorphisms of PrP with reference to onset of scrapie in Suffolk and Corriedale sheep in Japan. **Journal of General Virology**, v.76, p. 2577-2581, 1995.

JEFFREY, M. Scrapie: phenotypes, case definitions and strains. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. **Abstracts**...London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 35.

JEFFREY, M.; MCGOVERN, G.; MARTIN, S.; GOODSIR, C.M.; BROWN, KL: Cellular and sub-cellular localization of PrP in the lymphoreticular system of mice and sheep. **Archives of Virology**, v. 16, p. 23-28, 2000.

JEFFREY, M.; MARTIN, S.; GONZÁLEZ, L.; RYDER, S.J.; BELLWORTHY, S.J.; JACKMAN, R. Differential diagnosis of infections with the bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie agents in sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v. 125, n. 4, p. 271-284, 2001.

JOHNSON, C.J.; PHILLIPS, K.E.; SCHRAMM, P.T.; MCKENZIE, D.; AIKEN, J.M.; PEDERSEN, J.A. Prions adhere to soil minerals and remain infectious. **PLoS Pathogens**, v. 2, n. 4, e32, 2006.

JUNGHANS, F.; TEUFEL, B.; BUSCHMANN, A.; STENG, G.; GROSCHUP, M.H. Genotyping of German sheep with respect to scrapie susceptibility. **Veterinary Record**, v. 143, p. 340-341, 1998.

KIMBERLIN, R.H. Scrapie agent: Prions or virinos? **Nature**, v. 297, p: 107-108, 1982.

KUTZER, T.; PFEIFFER, I.; BRENIG, B. Identification of new allelic variants in the ovine prion protein (PrP) gene. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 119, p. 201-208, 2002.

LAMPERT, P.W.; GAJDUSEK, D.C.; GIBBS, C.J.JR. Subacute spongiform virus encephalopathies. Scrapie, Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease: a review. **American Journal of Pathology**, v. 68, n. 3, p. 626-652, 1972.

LAN, Z.; WANG, Z.L.; LIU, Y.; ZHANG, X. Prion protein gene (PRNP) polymorphisms in Xinjiang local sheep breeds in China. **Archives of Virology**, v. 151, p. 2095-2101, 2006.

LAPLANCHE, J. L.; CHATELAIN, J.; BEAUDRY, P.; DUSSAUCY, M.; BOUNNEAU, C.; LAUNAY, J.M. French autochthonous scrapied sheep without the 136Val PrP polymorphism. **Mammalian Genome**, v.4, n. 8, p. 463-464, 1993.

LAUDE, H. Biological characterization of isolates in transgenic models. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. **Abstracts**...London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 48.

LeDUR, A.; BERINGUE, V.; ANDREOLETTI, O.; REINE, F.; LAI, T.L.; BARON, T.; BRATBERG, B.; VILOTTE, J.L.; SARRADIN, P.; BENESTAD, S.L.; LAUDE, H. A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 44. p. 16031-16036, 2005.

LEE, I.Y.; WESTAWAY, D.; SMIT, A.F.A.; WANG, K.; SETO, J., CHEN, L.; ACHARYA, C.; ANKENER, M.; BASKIN, D.; COOPER, C.; YAO, H.; PRUSINER, S.B.; HOOD, L.E. Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. **Genome Research**, n 8, p. 1022 – 1037, 1998.

LEITA, L.; FORNASIER, F.; NOBILI, M. de; BERTOLI, A.; GENOVESI, S.; SEQUI, P. Interactions of prion proteins with soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 1638-1644, 2006.

LIGIOS, C; SIGURDSON, C.J.; SANTUCCIU, C.; CARCASSOLA, G.;MANCO, G.C. et al. PrP^{Sc} in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis. **Nature Medicine**, v. 11, p. 1137–1138, 2005.

LIMA, A.C.B. de **Caracterização do gene PrP em ovinos da raça Santa Inês.**

Fortaleza, 2002. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará.

LÜHKEN, G.; BUSCHMANN, A.; GROSCHUP, M.H.; ERHARDT, G. Prion protein allele A₁₃₆H₁₅₄Q₁₇₁ is associated with high susceptibility to scrapie in purebred and crossbred German Merinoland sheep. **Archives of Virology**, v. 149, n. 8, p. 1571-1580, 2004.

McGOWAN, J.P. Scrapie in sheep. **Scottish Journal of Agriculture**, v. 5, p. 365-375, 1922.

MOLINA, A.; JUÁREZ, M.; RODERO, A. Merino sheep breed's genetic resistance to scrapie: genetic structure and comparison of five eradication strategies. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 75, p. 239-250, 2006.

MOUM, T.; OLSAKER, I.; HOPP, P.; MOLDAL, T.; VALHEIM, M.; MOUM, T.; BENESTAD, S.L. Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 231-235, 2005.

MUTINELLI, F.; AUFIERO, G.M.; POZZATO, N.; MARANGON, S.; AGRIMI, U.; VACARRI, G.; VINCENZI, G. Eradication of scrapie in a Massese sheep flock by PrP allele selection. **Veterinary Record**, v. 142, p. 60, 2003.

NÖREMARK, M. Atypical scrapie in Europe – an epidemiologist's view. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. **Abstracts...** London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 56.

O'DOHERTY, E.; AHERNE, M.; ENNIS, S.; WEAVERS, E.; HUNTER, N.; ROCHE, J.F.; SWEENEY, T. Detection of polymorphisms in the prion protein gene in a population of Irish Suffolk sheep. **Veterinary Record**, v. 146, p. 335-338, 2000.

O'DOHERTY, E.; AHERNE, M.; ENNIS, S.; WEAVERS, E.; ROCHE, J.F.; SWEENEY, T. Prion protein gene polymorphisms in pedigree sheep in Ireland. **Research in Veterinary Science**, v. 70, p. 51-56, 2001.

O'DOHERTY, E.; HEALY, A.; AHERNE, M.; HANRAHAN, J.P.; WEAVERS, E.; O'DOHERTY, M.; ROCHE, J.F.; GUNN, M.; SWEENEY, T. Prion protein (PrP) gene polymorphisms associated with natural scrapie cases and their flock-mates in Ireland. **Research in Veterinary Science**, v. 73, p. 243-250, 2002.

O'ROURKE, K.I.; MELCO, R.P.; MICKELSON, J.R. Allelic frequency of an ovine scrapie susceptibility gene. **Animal Biotechnology**, v. 7, p. 155-162, 1996.

O'ROURKE, K.I.; HOLYOAK, G.R.; CLARK, W.W.; MICKELSON, J.R.; WANG, S.; MELCO, R.P.; BESSER, T.E.; FOOTE, W.C. PrP genotypes and experimental scrapie in orally inoculated Suffolk sheep in the United States. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 975-978, 1997.

O'ROURKE, K.I.; BASZLER, T.V.; PARISH, S.M.; KNOWLES, D.P. Preclinical detection of PrP^{Sc} in nictitating membrane lymphoid tissue of sheep. **Veterinary Record**, v. 142, p. 489-491, 1998a.

O'ROURKE, K.I.; BASZLER, T.V.; MILLER, J.M.; SPRAKER, T.R.; RIGGLEMAN, I.S.; KNOWLES, D.P. Monoclonal Antibody F89/160.1.5 Defines a Conserved Epitope on the Ruminant Prion Protein. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 1750-1755, 1998b.

O'ROURKE, K.I.; BASZLER, T.V.; BESSER, T.E.; MILLER, J.M.; CUTLIP, R.C.; WELLS, G.A.H.; RYDER, S.J.; PARISH, S.M.; HAMIR, A.N.; COCKETT, N.E.; JENNY, A.; KNOWLES, D.P. Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3254-3259, 2000.

OIE. Terrestrial Animal Health Code. **Principles for recognizing a country or zone historically free from scrapie.**, appendix 3.8.6., 2006a, disponível em:

<http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en_INDEX.HTM#S> Acesso em 15 jan. 2006

OIE. Terrestrial Animal Health Code. **Scrapie.**, chapter 2.4.8., 2006b, disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en_INDEX.HTM#S> Acesso em 15 jan. 2006.

ONNASCH, H.; GUNN, H.M.; BRADSHAW, B.J.; BENESTAD, S.L.; BASSETT, H.F. Two Irish cases of scrapie resembling Nor98. **Veterinary Record**, v 155, n. 20, p. 636-637, 2004.

ORGE, L.; GALO, A.; MACHADO, C.; LIMA, C.; OCHOA, C.; SILVA, J.; RAMOS, M.; SIMAS, J.P. Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 11, p. 3487-3491, 2004.

PARAMITHIOTIS, E.; PINARD, M.; LAWTON, T.; LABOISSIERE, S.; LEATHERS, V.L.; ZOU, W-Q.; ESTEY, L.A.; LAMONTAGNE, J.; LEHTO, M.T.; KONDEJEWSKI, L.H.; FRANCOEUR, G.P.; PAPADOPOULOS, M.; HAGHIGHAT, A.; SPATZ, S.J. HEAD, M.; WILL, R.; IRONSIDE, J.; O'ROURKE, K.; TONELLI, Q.; LEDEBUR, H.C.; CHAKRABARTTY, A.; CASHMAN, N.R. A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation. **Nature Medicine**, v. 9, n. 7, p. 893-899, 2003.

POHL DE SOUZA, F.P.; SOTOMAIOR, C.S.; OLLHOFF, R.D.; RODRIGUES, N. Ocorrência de três casos de tremor enzoótico dos ovinos. In: IV CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE ESPECIALISTAS EM PEQUENOS RUMINANTES E CAMELÍDEOS SUL-AMERICANOS, 2005, Curitiba. **Anais do IV Congresso Latino-Americano de Especialistas em Pequenos Ruminantes e Camelídeos Sul-Americanos**. 2005.

PRUSINER, S.B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. **Science**, v. 216, p. 136-144, 1982.

PRUSINER, S.B. Prions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 13363-13383, Nobel Lecture, 1998.

PRUSINER, S.B. An introduction to prion biology and diseases. In: _____. (Ed.). **Prion Biology and Diseases**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004a, p. 1 – 87.

PRUSINER, S.B. Development of the prion concept. In: _____. (Ed.). **Prion Biology and Diseases**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004b, p. 89 – 141.

PRUSINER, S.B.; WILLIAMS, E.; LAPLANCHE, J.L; SHINAGAWA, M. Scrapie, Chronic Wasting Disease, and Transmissible Mink Encephalopathy. In: PRUSINER, S.B. (Ed.). **Prion Biology and Diseases**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004, p. 545 – 594.

RIBEIRO, L.A.O. Enfermidades de ruminantes diagnosticadas no CPVDF, RS. Anais. Encontro de Laboratórios de Diagnóstico Veterinário do Cone Sul, 1, Campo Grande, p. 89-95, 1996.

RIBEIRO, L.A.O.; PASSOS, D.T.; MAROSO, J.A.; WEIMER, T.A.; RODRIGUES, N.C. Preliminary results of scrapie genotyping in brazilian suffolk sheep. SIXTH INTERNATIONAL SHEEP VETERINARY CONGRESS, 2005, Greece. **Proceedings...** Greece: Fthenakis and McKaller, 2005, p. 274-275.

ROCHA, R.A.; AMARANTE, A.F.T.; BRICARELLO, P.A. Comparison of the susceptibility of Santa Inês and Ile de France ewes to nematode parasitism around parturition and during lactation. **Small Ruminant Research**, v. 55, p. 65-75, 2004.

RODEN, J. A.; NIEUWHOF, G.J.; BISHOP, S.C.; JONES, D.A.; HARESIGN, W.; GUBBINS, S. Breeding programmes for TSE resistance in British sheep. I. Assessing the impact on prion protein (PrP) genotype frequencies. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 73, n. 1, p. 1-16, 2006.

ROELS, S.; VANOPDENBOSH, E.; LANGEVELD, J.P.M.; SCHREUDER, B.E.C. Immunohistochemical evaluation of tonsillar tissue for preclinical screening of scrapie based on surveillance in Belgium. **Veterinary Record**, v. 145, p. 524-525, 1999.

ROUGHSEGE, T.; VILLANUEVA, B.; WOOLLIAMS, J.A. Determining the relationship between restorative potential and size of a gene bank to alleviate the risks inherent in a scrapie eradication breeding programme. **Livestock Science**, v. 100, p. 231-241, 2006.

RUPP, R.; SCHIBLER, L. et al. Evidence of chromosomal regions controlling somatic cell counts in dairy sheep from two QTL detection projects. In: International Workshop on Major Genes and QTL in Sheep and Goats, 2003.

RYDER, S.; DEXTER, G.; BELLWORTHY, S.; TONGUE, S. Demonstration of lateral transmission of scrapie between sheep kept under natural conditions using lymphoid tissue biopsy. **Research in Veterinary Science**, v. 76, p. 211-217, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAUNDERS, G.C.; CAWTHRAW, S.; MOUNTJOY, S.J.; HOPE, J.; WINDL, O. PrP genotypes of atypical scrapie cases in Great Britain. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 3141-3149, 2006.

SCHREUDER, B. E. C.; VAN KEULEN, L. J. M.; VROMANS, M. E. W.; LANGEVELD, J. P. M.; SMITS, M. A. Preclinical test for prion disease. **Nature**, v.381, p. 563, 1996.

SCHREUDER, B.E.C.; VAN KEULEN, L.J.M.; VROMANS, M.E.W.; LANGEVELD, J.P.M.; SMITS, M.A. Tonsillar biopsy and PrPSc detection in the preclinical diagnosis of scrapie. **Veterinary Record**, v. 142, p. 564-568, 1998.

SCHUTZ, E.; SCHARFENSTEIN, M.; BRENIG, B. Genotyping of ovine prion protein gene (*PRNP*) variants by PCR with melting curve analysis. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 7, p. 1426-1429, 2006.

SEABURY, C. M; DERR, J.N. Identification of a novel ovine PrP polymorphism and scrapie-resistant genotypes for St. Croix White and a related composite breed. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 102, n. 1-4, p. 85-88, 2003.

SIPOS, W.; KRAUS, M.; SCHMOLL, F. ACHMANN, R.; BAUMGARTNER, W. PrP genotyping of Austrian sheep breeds. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 49, n. 8, p. 415-418, 2002.

SIVAM, K.; BAYLIS, M.; GRAVENOR, M. B.; GUBBINS, S.; WILESMITH, J. W. Results of a postal survey in 2002 into the occurrence of scrapie in Great Britain. **Veterinary Record**, v. 153, p. 782–783, 2004.

SPIROPOULOS, J. Biological characterization of isolates in wild rodents. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. **Abstracts**...London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 47.

STACK, M. Molecular characterization of scrapie isolates: an evaluation of discriminatory techniques. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. **Abstracts**...London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 46.

THORGEIRSDOTTIR, S.; SIGURDARSON, S.; THORISSON, H.M.; GEORGSSON, G.; PALSDOTTIR, A. PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 2527-2534, 1999.

TONGUE, S.C.; WILESMITH, J.W.; COOK, C.J. Frequencies of prion protein (PrP) genotypes and distribution of ages in 15 scrapie affected flocks in Great Britain. **Veterinary Record**, v. 154, p. 9-16, 2004.

TONGUE, S.C.; WEBB, P.; SIMMONS, M.M.; GUBBINS, S. Prevalence of scrapie infection in cull animals from 14 scrapie-affected flocks in Great Britain. **Veterinary Record**, v. 157, p. 480-482, 2005.

TOUZEAU, S.; CHASE-TOPPING, M. E.; MATTHEWS, L.; LAJOUS, D.; EYCHENNE, F.; HUNTER, N.; FOSTER, J. D.; SIMM, G.; ELSESEN, J.M.; WOOLHOUSE, M.E.J. Modelling the spread of scrapie in a sheep flock: evidence for increased transmission during lambing seasons. **Archives of Virology**, v. 151, p. 735-751, 2006.

TOWNSEND, S.J.; WARNER, R.; DAWSON, M. PrP genotypes of rare breeds of sheep in Great Britain. **Veterinary Record**, v. 156, p. 131-134, 2005.

TRANULIS, M. A.; OSLAND, A.; BRATBERG, B.; ULVUND, M.J. Prion protein gene polymorphisms in sheep with natural scrapie and healthy controls in Norway. **Journal of General Virology**, v. 80, n. 4, p. 1073-1077, 1999.

VACCARI, G.; PETRAROLI, R.; AGRIMI, U.; ELEN, C.; PERFETTI, M.G.; DiBARI, M.A.; MORELLI, L.; LIGIOS, C.; BUSANI, L.; NONNO, R.; DiGUARDO, G. PrP genotype in Sarda breed sheep and its relevance to scrapie. **Archives of Virology**, v. 146, p. 2029-2037, 2001.

VACCARI, G.; CONTE, M.; MORELLI, L.; DiGUARDO, G.; PETRAROLI, R.; AGRIMI, U. Primer extension assay for prion protein genotype determination in sheep. **Molecular and Cellular Probes**, v. 18, p. 33-37, 2004.

VAN KEULEN, L.J.; SCHREUDER, B.E.; MELOEN, R.H.; MOOIJ-HARKES, G.; VROMANS, M.E.; LANGEVELD, J.P. Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 1228-1231, 1996.

VARGAS, F.; BOLEA, R.; MONLEÓN, E.; ACÍN, C.; VARGAS, A.; DE BLAS, I.; LUJÁN, L.; BADIOLA, J.J. Clinical characterization of natural scrapie in a native Spanish breed of sheep. **Veterinary Record**, v. 156, p. 318-320, 2005.

VITEZICA, Z.G.; MORENO, C.R.; BODIN, L.; FRANCOIS, D.; BARILLET, F.; BRUNEL, J.C.; ELSEN, J.M. No associations between PrP genotypes and reproduction traits in INRA 401 sheep. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 6; p. 1317- 1322, 2006.

WELLS, G.A.; SCOTT, A.C.; JOHNSON, C.T.; GUNNIG, R.F.; HANCOCK, R.D.; JEFFREY, M.; DAWSON, M. BRADLEY, R. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. **Veterinary Record**, v.121, p. 419-20, 1987.

WELLS, G.A.; WILESMITH, J.W. Bovine spongiform encephalopathy and related diseases. In: PRUSINER, S.B. (Ed.). **Prion Biology and Diseases**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004, p. 595-628.

WESTAWAY, D.; ZULIANI, V.; COOPER, C.M.; COSTA, M. da; NEUMAN, S.; JENNY, A.L.; DETWILLER, L.; PRUSINER, S.B. Homozygosity for prion protein alleles encoding glutamine-171 renders sheep susceptible to natural scrapie. **Genes and Development**, v. 8, p. 959-969, 1994.

WILL, R.G. The epidemiology of Variant Creutzfeldt-Jakob Disease. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. **Abstracts**...London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 29.

WILL, R.G.; IRONSIDE, J.W.; ZEIDLER, M.; COUSENS, S.N.; ESTIBEIRO, K; ALPEROVITCH, A.; POSER, S.; POCHIARI, M.; HOFMAN, A.; SMITH, P.G. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. **Lancet**., v. 347, p. 921-925, 1996.

WINDIG, J.J.; EDING, H.; MOLI, L.; KAAL, L. Effects on inbreeding of different strategies aimed at eliminating scrapie sensitivity alleles in rare sheep breeds in The Netherlands. **Animal Science**, v.79, p 11-20, 2004.

ZHOU, H.; HICKFORD, J.G.H.; FANG, Q. Technical Note: Determination of alleles of the ovine *PRNP* gene using PCR–single-strand conformational polymorphism analysis. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 745-749, 2005.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.